

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-128

(P2004-128A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

4 B O 2 4

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/02

4 B O 6 3

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/42

C 1 2 Q 1/42

C 1 2 Q 1/44

C 1 2 Q 1/44

G O 1 N 33/53

D

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-331107 (P2002-331107)  
 (22) 出願日 平成14年11月14日 (2002.11.14)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-103495 (P2002-103495)  
 (32) 優先日 平成14年4月5日 (2002.4.5)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 396020800  
 科学技術振興事業団  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (74) 代理人 100080034  
 弁理士 原 謙三  
 (72) 発明者 岡 剛史  
 岡山県岡山市津島中1丁目4番2-304号  
 (72) 発明者 大内田 守  
 岡山県岡山市門田屋敷2丁目2番58-106号  
 Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA12 CA20 HA09  
 HA12 HA20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血器腫瘍細胞検出方法および造血器腫瘍細胞検出キット

(57) 【要約】

【課題】 分子生物学的知見を利用して、造血器腫瘍細胞の高感度かつ高特異的に検出する造血器腫瘍細胞検出方法および検出キットを提供する。

【解決手段】 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を定量するとともに、上記検体試料から得られる S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する。これによって、一つの遺伝情報により造血器腫瘍細胞の有無を2段階で確認するため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(1) 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認するSHP1遺伝子メチル化確認工程、

(2) 上記検体試料から得られるSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方の発現量を定量するSHP1遺伝子産物定量工程、および、

(3) 上記検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(LOH)の有無を確認するSHP1遺伝子LOH確認工程、

の少なくとも何れかを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出方法。

10

## 【請求項2】

上記SHP1遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、

上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を実施する遺伝子増幅試行段階と、

増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれることを特徴とする請求項1に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

20

## 【請求項3】

上記プライマーが、さらに、配列番号1または2に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項2に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

## 【請求項4】

上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することを特徴とする請求項2または3に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

## 【請求項5】

上記遺伝子切断試行段階では、制限酵素として、メチル化感受性制限酵素を用いることを特徴とする請求項2、3または4に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

30

## 【請求項6】

上記SHP1遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、

重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、SHP1遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれることを特徴とする請求項1に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

## 【請求項7】

上記メチル化シトシン含有判定段階では、PCRによりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかが用いられることを特徴とする請求項6に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

40

## 【請求項8】

上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることを特徴とする請求項6または7に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

## 【請求項9】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量することを特徴とする請求項1ないし8の何れか1項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

## 【請求項10】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法またはウエスタンブロッティング法に

50

より S H P 1 蛋白質が定量されることを特徴とする請求項 9 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 1】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いて S H P 1 遺伝子の m R N A の発現を検出することにより、S H P 1 m R N A を定量することを特徴とする請求項 1 ないし 8 の何れか 1 項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 2】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、ノーザンブロッティング法、逆転写 P C R 法、リアルタイム P C R 法、または R N A i n s i t u ハイブリダイゼーション法により S H P 1 遺伝子の m R N A の発現が検出されることを特徴とする請求項 1 1 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。 10

【請求項 1 3】

異型接合性喪失の有無の確認は、上記 S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方、または、上記 S H P 遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型のような遺伝子多型を、P C R を用いたフラグメント解析により実施されることを特徴とする請求項 1 ないし 1 2 の何れか 1 項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 4】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

( 1 ) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、および 20

( 2 ) シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅する P C R 用のプライマーと、上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照 D N A とのうち、少なくとも一方を含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項 1 5】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

( 1 ) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、 30

( 2 ) 遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および

( 3 ) 配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項 1 6】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。 40

【請求項 1 7】

さらに、P C R 用試薬、および、制限酵素反応用試薬の少なくとも一方を含むことを特徴とする請求項 1 4、1 5 または 1 6 に記載の造血器腫瘍細胞検出キット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、造血器腫瘍細胞検出方法および該検出方法に好適に用いられる造血器腫瘍細胞検出キットに関するものであり、特に、例えば、悪性リンパ腫や白血病等に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子産物の発現減少あるいは消失またはこれを 50

コードする S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することによって、造血器腫瘍細胞を高感度かつ高特異的に検出できる検出方法および検出キットに関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ヒト ( H o m o s a p i e n s ) における悪性リンパ腫や白血病等の造血器腫瘍 ( 血液系の腫瘍 ) には、難治性で極めて予後の悪いものから比較的予後のよいものまで様々な種類が知られている。この造血器腫瘍の治療には、各種化学療法や放射線療法、あるいは免疫療法といった種々の療法がすでに実用化されているが、このような治療の結果、ほぼ腫瘍細胞が退縮したとしても、わずかに腫瘍細胞が生存していれば造血器腫瘍の再発は免れない。

10

【 0 0 0 3 】

上記造血器腫瘍の診断は、従来では、複数の診断手法を併用することにより総合的に実施されている。具体的には、末梢血や各種生検材料を用いて、組織染色や免疫染色等による形態学的な観察や組織学的な観察が実施されたり、さらには、種々の分子生物学的解析や染色体解析等も実施されたりしている。また、上記造血器腫瘍の診断では、判定までにかかなりの時間を要する。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

上記従来の各診断手法は、それ単独では造血器腫瘍細胞を高感度、高特異的、かつ迅速に検出できるものではない。それゆえ、これら従来の診断手法では、複数を併用して総合的に判断しなければ造血器腫瘍を診断することができない。

20

【 0 0 0 5 】

つまり、従来の診断手法を使用する限り、複数の診断手法を併用しなければならないため、診断の煩雑化を招くだけでなく時間がかかり、造血器腫瘍細胞検出感度も特異性も高くないことから、医師の専門的な判断が診断に大きな比重を占めることになる。そのため、従来では、造血器腫瘍の診断技術は、実質的に医療現場での利用に限られており、各々の疾患には対応できるが、集団検診による造血器腫瘍の早期発見・早期治療を目的としては利用されていない。

【 0 0 0 6 】

造血器腫瘍細胞をより高感度かつ高特異的に実施するには、造血器腫瘍細胞に特異的であり、かつ広い範囲の造血器腫瘍に見られる感度の高いマーカーを用いることが考えられる。このようなマーカーを用いれば、造血器腫瘍の早期発見・診断を容易かつ迅速に実施することができ、医療上、悪性リンパ腫や白血病等の早期治療や再発予防に応用することが可能となるだけでなく、臨床検査産業や医薬品産業等にも利用可能な診断技術とすることができ、産業の発展に寄与することが可能となる。しかしながら、このようなマーカーは現在までのところ知られていない。

30

【 0 0 0 7 】

本発明は上記課題に鑑みなされたものであって、その目的は、分子生物学的知見を利用して、迅速且つ簡便に造血器腫瘍細胞を高感度かつ高特異的に微量の患者検体から検出し造血器腫瘍の早期発見・診断および早期治療を容易にし、集団検診にも適用可能な造血器腫瘍細胞検出方法および検出キットを提供することにある。

40

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、広い範囲の悪性の造血器腫瘍では、プロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られ、しかも悪性度の高い造血器腫瘍において、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制の傾向が強くなることを見出し、S H P 1 遺伝子産物およびこれをコードする S H P 1 遺伝子の双方をマーカーとして用いることで、造血器腫瘍細胞の高感度、高特異的、かつ短時間に検出でき、かつ産業上利用できる造血器腫瘍細胞検出技術を実現し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

50

## 【0009】

すなわち、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、上記の課題を解決するために、(1)造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質およびSHP1 mRNAの少なくとも一方の発現量を定量するSHP1遺伝子産物定量工程、(2)上記検体試料から得られる、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認するSHP1遺伝子メチル化確認工程、および(3)上記検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(LOH)の有無を確認するSHP1遺伝子LOH確認工程、の少なくとも一方を含むことを特徴としている。

## 【0010】

上記SHP1遺伝子産物の発現抑制は、悪性の造血器腫瘍細胞に極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。また、上記SHP1蛋白質の発現抑制は、SHP1遺伝子のメチル化によるものである。さらに、DNAメチル化によるSHP1遺伝子の転写抑制の前後には、SHP1遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失している。

## 【0011】

上記方法によれば、上記知見を利用して、検体試料から得られるSHP1遺伝子のメチル化を確認し、造血器腫瘍細胞の存在を検出することで、悪性の造血器腫瘍細胞の存在の有無をスクリーニングし、一方検体試料中のSHP1遺伝子産物、具体的にはSHP1蛋白質、またはSHP1 mRNA、あるいはその両方の発現を定量する。

## 【0012】

すなわち、上記方法では、SHP1遺伝子の不活性化を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を4段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

## 【0013】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい一例としては、上記SHP1遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いてPCR法を実施する遺伝子増幅試行段階と、増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

## 【0014】

上記方法によれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の切断を試みることでメチル化の有無を区別し、さらにPCRを用いて増幅してから、得られる特定サイズのPCR産物の量を確認する。それゆえ、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

## 【0015】

上記検出方法においては、上記プライマーが、さらに、配列番号1または2に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることが好ましい。

## 【0016】

また、上記検出方法においては、上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することが好ましい。

## 【0017】

さらに、上記検出方法においては、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵

10

20

30

40

50

素として、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素が知られている制限酵素を用いることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい他の一例としては、上記 S H P 1 遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

【 0 0 1 9 】

上記方法によれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後の S H P 1 遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 2 0 】

上記検出方法においては、上記メチル化シトシン含有判定段階では、P C R によりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法による遺伝子の処理のうち、少なくとも何れかが用いられても好ましい。

【 0 0 2 1 】

上記方法によれば、少なくとも P C R を用いることで、検体試料から微量の S H P 1 遺伝子さえ得られれば、S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 2 2 】

上記検出方法においては、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることが好ましい。また、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩とともに尿素が併用されてもよい。

【 0 0 2 3 】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法であっても、上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体を用いて S H P 1 蛋白質を定量すると好ましい。具体的には、上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法（免疫組織化学法、免疫細胞化学法、E L I S A ( e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y ) 法）またはウエスタンブロッティング法により S H P 1 蛋白質が定量されると好ましい。

【 0 0 2 4 】

上記方法によれば、抗原抗体反応を利用して S H P 1 蛋白質を定量することになるので、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 2 5 】

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法であっても、上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いて S H P 1 遺伝子の m R N A の発現を検出することにより、S H P 1 m R N A を定量しても好ましい。具体的には、上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、ノーザンブロッティング法、逆転写 P C R 法、リアルタイム逆転写 P C R 法、または R N A i n s i t u ハイブリダイゼーション法により S H P 1 遺伝子の m R N A の発現が検出されると好ましい。

【 0 0 2 6 】

上記方法によれば、S H P 1 遺伝子産物として S H P 1 遺伝子の m R N A により S H P 1 遺伝子産物を定量することになるので、S H P 1 遺伝子の c D N A と相同性を有するオリゴペプチドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで高特異

的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0027】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましいさらに他の一例としては、異型接合性喪失の有無の確認は、上記SHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方、または、上記SHP1遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型のような遺伝子多型を、PCRを用いたフラグメント解析することにより実施される方法を挙げることができる。このとき用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料であればよい。また、対照としては、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよい、他の正常組織細胞を用いてもよい。

【0028】

上記の方法によれば、マイクロサテライト・マーカまたは単一塩基多型(SNP)等の遺伝子多型の異型接合性喪失をPCRにより確認することによって、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認しているのので、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0029】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体、および、(2)シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するPCR用のプライマーと、上記SHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAとのうち、少なくとも一方を含む構成を挙げることができる。

【0030】

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)上記SHP1抗体、および(2)遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および、(3)配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つPCR用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含む構成を挙げることができる。

【0031】

さらには、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましいさらに他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーを含む構成を挙げることができる。

【0032】

上記造血器腫瘍細胞検出キットにおいては、さらに、PCR用試薬、および、制限酵素反応用試薬の少なくとも一方を含むことが好ましい。

【0033】

上記何れの構成であっても、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ迅速に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

【0034】

【発明の実施の形態】

【実施の形態1】

本発明における実施の一形態について図1ないし図24に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0035】

10

20

30

40

50

本発明は、造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロモーターからのプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子産物すなわち S H P 1 蛋白質と m R N A とを定量するとともに、上記検体試料から得られる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認することで、上記検体試料中から造血器腫瘍細胞を検出する技術である。

【 0 0 3 6 】

本発明で、造血器腫瘍細胞を検出するためのマーカーとして用いられる S H P 1 遺伝子は、染色体 1 2 p 1 3 に存在し、図 1 ～図 1 0 および配列番号 1 に示す塩基配列をゲノム D N A (ワイルドタイプ) のセンス鎖とし、図 1 1 ～図 2 0 および配列番号 2 に示す塩基配列をアンチセンス鎖とする 1 6 のエキソン (図および配列表中大文字で示す領域) を有する遺伝子である。その c D N A は、図 2 1 および配列番号 3 に示す塩基配列を有する約 1 . 8 k b のサイズを有している。なお、S H P 1 遺伝子は S H - P T P 1 , P T P 1 C , H C P , H C P H , P T P N 6 , H P T P 1 C , S H P - 1 L と同一の遺伝子である。

10

【 0 0 3 7 】

上記 S H P 1 遺伝子にコードされている S H P 1 蛋白質は、分子量 6 8 k D で、各種造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ ( P T P a s e ) であり、図 2 2 に示すように、N 末端側にタンデム構造となる 2 つの S H 2 ( S r c h o m o l o g y d o m a i n 2 ) 領域 ( 2 7 0 アミノ酸残基 ) と、2 4 6 アミノ酸残基の P T P a s e ドメインと、9 3 アミノ酸残基の C 末端側領域とを有する構造となっている。また、図 2 3 および配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有している。

20

【 0 0 3 8 】

ヒトの造血器腫瘍、例えば悪性リンパ腫や白血病では、多くの種類で 9 0 % 以上の高い頻度で S H P 1 蛋白質の強い発現抑制が見られる (例えば、A m e r i c a n J o u r n a l o f P a t h o l o g y , V o l . 1 5 9 , N o . 4 , O c t o b e r 2 0 0 1 : 1 4 9 5 - 1 5 0 5 等参照)。このように悪性の造血器腫瘍細胞では、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。

【 0 0 3 9 】

本発明者らは、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制が、上記 S H P 1 遺伝子がメチル化されることによる転写異常を原因とすることを独自に見出した。

30

【 0 0 4 0 】

例えば、図 2 4 に示すように、図 1 ～図 1 0 および配列番号 1 に示すゲノム D N A (ワイルドタイプ) のセンス鎖 ( 1 8 1 塩基 ～ 2 1 6 0 塩基まで例示 ) において、1 0 0 1 塩基 ～ 1 1 6 3 塩基のエキソン (図中大文字) の前にプロモーター領域が存在するが、この近傍にシトシン ( C ) とグアニン ( G ) とが並ぶ C G 配列が多く存在し C p G 島 ( C p G i s l a n d ) を形成している (図 2 4 中では C G 配列を太字の網掛けで示す)。正常な造血器細胞では、この C p G 島のシトシンはメチル化されていないが、例えば悪性のリンパ腫細胞では、上記 C G 配列のシトシンの多くがメチル化されている。勿論、この C G 配列におけるシトシンのメチル化はセンス鎖のみならずアンチセンス鎖にも同じように生じる。

40

【 0 0 4 1 】

上記 C p G 島における C G 配列の高度なメチル化は、S H P 1 遺伝子の D N A から m R N A の転写を阻害し、その結果、S H P 1 蛋白質の生産が抑制される。この現象は、上述したように造血器腫瘍細胞では極めて高頻度に見られる。しかも、各種造血器腫瘍患者の完全寛解期には、S H P 1 遺伝子における D N A のメチル化が完全に消失し、分子生物学上の知見と臨床上の知見との間に非常に高い相関関係が見られる。それゆえ、メチル化による S H P 1 遺伝子の発現抑制が、造血器腫瘍細胞の発症機構の中で重要な役割を果たしていることが推測される。そこで本発明では、上記 S H P 1 遺伝子の発現抑制という現象を、造血器腫瘍細胞のマーカーとして利用する。

【 0 0 4 2 】

50



さらに、本発明者らは、悪性リンパ腫や白血病等の疾患が発症する際に、上述した、DNAメチル化によってSHP1遺伝子の転写抑制が生じる前後に、SHP1遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失することも独自に見出した。そこで、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認することによって、SHP1遺伝子の対立遺伝子の喪失を確認することが可能となる。それゆえ、SHP1遺伝子の異型接合性喪失も造血器腫瘍細胞のマーカーとして利用することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

悪性リンパ腫や白血病において、SHP1遺伝子には、高頻度のDNAメチル化、高頻度の異型接合性喪失、SHP1遺伝子の発現の低下または消失が検出され、さらには、外来SHP1遺伝子導入が血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にある。これにより、SHP1 10  
遺伝子が癌抑制遺伝子の一つであることが強く示唆される。

#### 【 0 0 4 4 】

そこで、本発明では、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、上記検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認し、SHP1遺伝子産物定量工程にて、造血器細胞を含む検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびmRNAの少なくとも一方を定量し、さらに、SHP1遺伝子LOH確認工程で、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認するという三つの工程を利用する。これら工程は単独で用いられても良いし、双方ともに用いられても良い。さらに、SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質のみ定量されても良いし、SHP1mRNAのみ検出されても良いし、双方ともに検出されてもよい。 20

#### 【 0 0 4 5 】

これによって、例えば、まず、検体試料中のSHP1遺伝子のメチル化を検出することでスクリーニングし、その後、検体試料のSHP1遺伝子産物の発現をSHP1mRNAおよびSHP1蛋白質の少なくとも一方で定量することで、悪性の造血器腫瘍細胞の有無を確認することで造血器腫瘍細胞の存在を確定するという検出プロセスを実施することができる。

#### 【 0 0 4 6 】

したがって、本発明では、SHP1遺伝子の発現を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を3段階で 30  
確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

#### 【 0 0 4 7 】

また、上述したように、本発明におけるSHP1遺伝子を導入することで、血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にあることも確認されている。それゆえ、SHP1遺伝子は、遺伝子治療に用いることも可能であり、例えば、腫瘍細胞にSHP1遺伝子の発現ベクターをトランスフェクトすることにより、腫瘍細胞の増殖を抑制することが期待できる。

#### 【 0 0 4 8 】

本発明で用いられる検体試料は、末梢血あるいは骨髓液等の造血器細胞を含む検体試料であればどのような検体試料であっても特に限定されるものではない。本発明における造血器細胞とは、各種血液細胞を含むが、特に好ましくは各種白血球が挙げられる。より具体的には、リンパ球（T細胞・B細胞）、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）、単球並びにマクロファージ、マスト細胞、ナチュラルキラー細胞等を挙げることができる。あるいは造血幹細胞やリンパ球幹細胞であってもよい。 40

#### 【 0 0 4 9 】

したがって、本発明で用いられる検体試料には、上記造血器細胞が含まれている血液や骨髓液あるいは体液等をヒトから採取し、これをそのまま検体試料として用いてもよいし、採取した血液や体液に対して従来公知の処理を施すことによって、分子生物学的な分析を実施し易い分析用検体試料としてもよい。

#### 【 0 0 5 0 】

本発明が適用可能な造血器腫瘍としては、具体的には、例えば、慢性骨髄性白血病、フィラデルフィア染色体ポジティブ（+（9；22）（qq34；q11），BCR／ABL）慢性骨髄性白血病、慢性好中球白血病、慢性好酸球白血病／高好酸球症候群、慢性突発性骨髄繊維症、真性多血症、本態性血小板増加症、その他分類できない骨髄増殖性疾患等の各種骨髄増殖性疾患；

慢性骨髄性単球白血病、非定型慢性骨髄性白血病、幼年性骨髄性単球白血病等の骨髄異型性／骨髄増殖性疾患；

環状鉄芽球を伴う難治性貧血、環状鉄芽球を伴わない難治性貧血、多系列異形成を伴う難治性血球減少症（骨髄異型性症候群）、過剰芽球5q-症候群を伴う難治性貧血（骨髄異型性症候群）、その他分類できない骨髄異型性症候群等の骨髄異型性症候群；

再発性細胞遺伝学的転座を伴う急性骨髄性白血病（AML）（例えば、+（8；21）（q22；q22）を伴うAML、AML1（CBF- $\alpha$ ）／ETO、急性前骨髄性白血病（+（15；17）（q22；q11-12）を伴うAMLおよびその変形、PML／RAR- $\alpha$ ）、異常な骨髄好酸球（inv（16）（p13q22）あるいは+（16；16）（p13；q11）、CBF $\beta$ ／MYH11X）を伴うAML、11q23（MLL）異常を伴うAML、前骨髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴うAML、前骨髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴わないAML、治療に関係するAMLおよび骨髄異型性症候群（アルキル化剤に関係する治療、エピドフィロトキシンに関係する治療、あるいはその他のタイプの治療）、他に部門に属さないAML（低分化型、成熟を伴わないもの、成熟を伴うもの、急性骨髄性単球白血病、急性単球白血病、急性赤芽球白血病、急性巨核球白血病、急性好塩基球白血病、骨髄繊維症を伴う急性汎骨髄過剰増殖症）、急性二形質性白血病等の急性骨髄性白血病（AML）；

前駆体B細胞性腫瘍（前駆体B-リンパ芽球性白血病／リンパ腫（前駆体B細胞急性リンパ芽球性白血病）、成熟（末梢）B細胞性腫瘍（B細胞慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁領域B細胞リンパ腫（+／-絨毛リンパ球）、毛状細胞白血病、形質細胞性骨髄腫（形質細胞腫）、MAL T型節外辺縁型B細胞リンパ腫、節性辺縁型B細胞リンパ腫（+／-単球型B細胞）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大型B細胞リンパ腫（縦隔大細胞B細胞リンパ腫、原発性滲出リンパ腫）、Burkittリンパ腫／Burkitt細胞白血病）等のB細胞性腫瘍；

前駆体T細胞性腫瘍（前駆体T-リンパ芽球性白血病／リンパ腫（前駆体T細胞急性リンパ芽球性白血病）、成熟（末梢）T細胞性腫瘍（T細胞前リンパ球性白血病、T細胞顆粒リンパ球白血病、侵襲型NK細胞白血病、成人T細胞リンパ腫・白血病（HTLV1+）、鼻型節外性NK／T細胞リンパ腫、腸管症型T細胞リンパ腫、肝脾型 $\gamma$ - $\delta$ T細胞リンパ腫、皮下蜂窩織炎様T細胞リンパ腫、菌状息肉腫／Sezary症候群、退形成性大型細胞リンパ腫（T／ヌル細胞、原発性皮膚未分化型）、他に部門に属さない末梢T細胞リンパ腫、血管免疫芽球T細胞リンパ腫）等のT細胞およびNK細胞性腫瘍；

節性リンパ球優勢ホジキンリンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫（結節硬化ホジキンリンパ腫（等級1および2）、リンパ球リッチ古典的ホジキンリンパ腫、混合細胞型ホジキンリンパ腫、リンパ球枯渇ホジキンリンパ腫）等のホジキンリンパ腫（ホジキン病）；

等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

#### 【0051】

本発明におけるSHP1遺伝子産物定量工程は、検体試料中のSHP1蛋白質およびSHP1 mRNAの少なくとも一方を定量できる方法であれば特に限定されるものではないが、具体的には、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量する方法（蛋白質定量法）か、SHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、SHP1 mRNAを定量する方法（mRNA定量法）を好適に用いることができる。

#### 【0052】

まず、上記蛋白質定量法のより具体的な手法としては、SHP1抗体を用いたウエスタンブロッティング法または酵素抗体法（Immunochemistry）（免疫組織化学

10

20

30

40

50

法、免疫細胞化学法、E L I S A ( e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y ) 法) を挙げることができる。

【 0 0 5 3 】

上記蛋白質定量法で用いられるSHP1抗体は、図22、図23および配列番号4に示す構造を有するSHP1蛋白質の少なくとも一部の構造を抗原決定基として認識し、SHP1蛋白質を免疫学的に確実に検出できる抗体であれば特に限定されるものではなく、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。

【 0 0 5 4 】

上記SHP1抗体は、従来公知の方法で製造してもよいし、市販のSHP1抗体を用いてもよい。SHP1抗体の製造方法としては、例えば、モノクローナル抗体であれば、SHP1蛋白質で免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスの骨髓細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生する手法が挙げられる。また、上記SHP1抗体がポリクローナル抗体であれば、SHP1蛋白質で免疫したウサギの免疫血清から精製する手法が挙げられる。また、市販のSHP1抗体としては、#SH-PTP1(D-11):sc7289および#SH-PTP1(C-19):sc287(Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)、#anti SHPTP(06117)および#anti mouse SHPTP(05281) )

(Upstate Biotechnology Inc. 製) 等が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

上記SHP1抗体を用いた酵素抗体法(免疫組織化学法、免疫細胞化学法、ELISA法)は、従来公知の方法(例えば、『酵素抗体法』渡辺慶一・中根一穂編集、学際企画出版(昭和61年)や、Brown R. W. et al: Modern Pathol. 199; 8(5):515-20(1995)等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【 0 0 5 6 】

同様に、上記SHP1抗体を用いたウエスタンブロッティング法も、従来公知の方法(例えば、『実験操作ブロッティング法』日野嘉幸他編、ソフトサイエンス社(昭和62年)や、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, (1979) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いること

【 0 0 5 7 】

上記蛋白質定量法を用いることで、抗原抗体反応を利用してSHP1蛋白質を定量することになる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 5 8 】

次に、上記mRNA定量法のより具体的な手法としては、配列番号3(図21参照)に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出する方法が挙げられ、より具体的には、ノーザンブロッティング法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(real time RT-PCR)、またはRNA in situハイブリダイゼーションを挙げることができる。

【 0 0 5 9 】

上記ノーザンブロッティング法、RT-PCR、real time RT-PCR、およびRNA in situハイブリダイゼーションの何れの方法も従来公知の方法(例えば、"Molecular cloning" a laboratory manual, Sambrook J., Russell DW., Cold Spring Harbor Lab Press. (2001)や、"Current protocols in molecular biology" edited by Ausubel FM et al., John Wiley & Sons Inc. (2

001) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【0060】

上記ノーザンブロッティング法やRNA in situ ハイブリダイゼーションでは、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの全長あるいはその一部をプローブとして用いることができる。また、RT-PCRやreal time RT-PCRでも、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの一部と相同性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることができる。具体的には、例えば、後述する実施例3や実施例4に示すプライマーペアを用いることができる。

【0061】

それゆえ、mRNA定量法では、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出すればよい。

10

【0062】

上記mRNA定量法を用いることで、SHP1遺伝子の転写産物であるSHP1mRNAを定量することになるので、SHP1遺伝子のcDNAと相同性を有するポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで迅速、高特異的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0063】

本発明におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程は、検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認できる方法であれば特に限定されるものではないが、本実施の形態では、例えば、遺伝子切断試行段階と、遺伝子増幅試行段階と、遺伝子増幅量確認段階とを含むメチル化感受性制限酵素を利用した方法(以下、説明の便宜上、制限酵素確認法と称する)を好適に用いることができる。

20

【0064】

本実施の形態で用いられるメチル化感受性制限酵素とは、二本鎖DNAにおいて認識対象となる塩基配列にシトシンを含んでおり、かつ、この塩基配列中のシトシンがメチル化された場合には、該塩基配列の二本鎖DNAを切断できない制限酵素であれば特に限定されるものではない。

【0065】

上記メチル化感受性制限酵素としては、具体的には、例えば、HpaII、EagIまたはNaeI等を挙げることができる。中でも、HpaIIをより好ましく用いることができる。HpaIIは、CCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNA切断するエンドヌクレアーゼであるが、同じ塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断する制限酵素として、MspIが知られている。

30

【0066】

上述したように、HpaIIはメチル化されたCCGGの塩基配列の二本鎖DNAを切断できないが、MspIはメチル化の有無に関わらずCCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断することが可能である。すなわち、MspIはメチル化非感受性制限酵素である。それゆえ、HspIIとMspIとを併用することで、後述するように、検体試料中のSHP1遺伝子の切断を確実に確認するためのコントロールとして利用することが可能になり、本実施の形態における制限酵素確認法の信頼性をより一層向上させることができる。

40

【0067】

このように、本実施の形態における制限酵素確認法では、使用するメチル化感受性制限酵素と同じ塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素をコントロールとして使用することが好ましい。勿論、メチル化感受性およびメチル化非感受性制限酵素の組み合わせは上記HspII・MspIに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0068】

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程、すなわち制限酵素確認法

50

による S H P 1 遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

【 0 0 6 9 】

まず、遺伝子切断試行段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識する上記メチル化感受性制限酵素で処理する。この段階では、メチル化感受性制限酵素の処理により遺伝子試料中に含まれる S H P 1 遺伝子の切断を試みる。すなわち、前記検体試料中に含まれる造血器細胞が正常な細胞のみであれば、S H P 1 遺伝子は切断されるが、造血器腫瘍細胞が含まれていれば、S H P 1 遺伝子は C G 配列がメチル化されているため切断されない。

【 0 0 7 0 】

前記検体試料から遺伝子試料を調製する方法は従来公知の方法を用いることができ特に限定されるものではない。また、調製された遺伝子試料は、S H P 1 遺伝子を含んでいればよく、制限酵素処理や P C R 等を阻害しない限り他の成分が含まれていても良い。それゆえ、前記検体試料中に含まれる造血器細胞やその他の細胞から抽出される各種 D N A や R N A の混合物であればよい。また、メチル化感受性制限酵素による処理についても特に限定されるものではなく、該メチル化感受性制限酵素の種類や調製された遺伝子試料の状態等に応じて、適宜条件等を設定すればよい。

【 0 0 7 1 】

次に、遺伝子増幅試行段階として、上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子試料に対して、上記 S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、P C R を実施する。この段階では、メチル化感受性制限酵素で処理した制限酵素処理物を、上記プライマーを用いて P C R 処理することにより、S H P 1 遺伝子のみの増幅を試みる。正常な S H P 1 遺伝子のみであれば、プライマーペアに挟まれる領域が切断されているため S H P 1 遺伝子は増幅できないが、メチル化されている S H P 1 遺伝子が含まれていれば、上記プライマーペアに挟まれる領域は切断されていないため S H P 1 遺伝子が増幅される。

【 0 0 7 2 】

上記遺伝子増幅試行段階で用いられる上記プライマーとしては、メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅するポリヌクレオチドであればよい。それゆえプライマーの設計条件等についても特に限定されるものではない。基本的には、本実施の形態で用いられるプライマーペアは、メチル化感受性制限酵素に認識される上記塩基配列を含む領域の少なくとも外側に位置し、配列番号 1 または 2 ( 図 1 ~ 図 1 0 および図 1 1 ~ 図 2 0 参照 ) に示す S H P 1 遺伝子の塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであればよく、その場所やサイズ等については特に限定されるものではない。

【 0 0 7 3 】

次に、遺伝子増幅量確認段階として、増幅された遺伝子の量を確認する。この段階では、S H P 1 遺伝子が増幅されたか否かを確認する。S H P 1 遺伝子が増幅されれば、元の検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

【 0 0 7 4 】

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられる S H P 1 遺伝子の有無の確認方法としては特に限定されるものではないが、電気泳動法を用いてマーカと比較することにより遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングして検出してもよい。

【 0 0 7 5 】

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられる S H P 1 遺伝子の有無の確認方法としては特に限定されるものではないが、検体試料と同時にメチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A を用いて反応を行った後電気泳動法を用いて遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングして検出してもよい。

## 【 0 0 7 6 】

上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A は、S H P 1 遺伝子を用いたものであればよく、特に限定されるものではない。具体的には、メチル化感受性制限酵素またはメチル化非感受性制限酵素により処理することで得られる、増幅量を比較できる程度の濃度を有する D N A 溶液を挙げることができる。

## 【 0 0 7 7 】

さらに、制限酵素確認法による S H P 1 遺伝子メチル化確認工程では、コントロールとして、メチル化感受性制限酵素による処理と並行して、同一の検体試料をメチル化非感受性制限酵素で処理して、それを遺伝子増幅量確認段階で確認すると好ましい。すなわち、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵素として、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受制限酵素が知られている制限酵素を用いることが非常に好ましい。これによって、制限酵素確認法による S H P 1 遺伝子のメチル化の確実性を高めることができる。

## 【 0 0 7 8 】

本発明における S H P 1 サテライト L O H 確認工程は、造血器細胞を含む検体試料において、この検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失 ( L o s s o f h e t e r o z y g o s i t y , L O H と略す) の有無を確認することができる方法であれば特に限定されるものではないが、具体的には、S H P 1 遺伝子を挟み込むマイクロサテライト・マーカー、または、上記 S H P 1 遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型 ( s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m , S N P ) のような遺伝子多型 ( p o l y m o r p h i s m ) について、P C R を用いたフラグメント解析によって L O H を確認する方法を好適に用いることができる。

## 【 0 0 7 9 】

上記 S H P 1 遺伝子の両側に存在するマイクロサテライト・マーカーや、S H P 1 遺伝子中またはその近辺に存在する遺伝子多型については、特に限定されるものではなく、どのようなマーカーを用いてもよいが、具体的には、例えば、D 1 2 S 3 3 6 マーカーおよび D 1 2 S 3 5 6 マーカーを挙げることができる。これらマーカーの塩基配列は、インターネット・ゲノム・データベース ( U R L : h t t p : / / g d b w w w . g d b . o r g . / ) から得られる。これらマーカーのうち、D 1 2 S 3 5 6 マーカーはテロメア側に存在し、S H P 1 遺伝子から約 4 . 4 c M の距離にある。一方、D 1 2 S 3 3 6 マーカーはセントロメア側に存在し、S H P 1 遺伝子から約 2 . 4 c M の距離にある。

## 【 0 0 8 0 】

検体試料における S H P 1 遺伝子の L O H (異型接合性喪失) の確認に際しては、S H P 1 サテライト L O H 確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料となっていればよい。また、L O H の具体的な方法は特に限定されるものではないが、後述する実施例 6 に示すように、P C R 反応によって上記各マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するマイクロサテライト解析を行えばよい。このときの P C R 反応他の条件も特に限定されるものではなく、P C R 用のプライマーとしては、例えば、D 1 2 S 3 3 6 マーカーまたは D 1 2 S 3 5 6 マーカーの少なくとも一部を検出できるようなプライマーであればよく、その他の条件についても適切な条件を適宜設定すればよい。

## 【 0 0 8 1 】

本発明における S H P 1 サテライト L O H 確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料であれば特に限定されるものではない。また、対照として用いる検体試料も特に限定されるものではなく、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよいし、他の正常組織細胞を用いてもよい。

## 【 0 0 8 2 】

このように、マイクロサテライト・マーカーや S N P 等の遺伝子多型を利用して S H P 1 遺伝子の L O H を確認することで、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

## 【 0 0 8 3 】

なお、本実施の形態では、SHP1遺伝子のLOHを、マイクロサテライト・マーカーや遺伝子多型を利用して確認した例を挙げているが、本発明はこれに限定されるものではなく、SHP1遺伝子のLOHが確認できる方法であればどのような方法でもよいことは言うまでもない。

【0084】

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

【0085】

まず、SHP1遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびSHP1 mRNAの少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量されたSHP1蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんどSHP1遺伝子産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

【0086】

次に、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、前記制限酵素確認法により、検体試料から調製した遺伝子試料中のSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認する。以下の説明では、メチル化感受性制限酵素として前記HpaIIを用いた例を挙げる。HpaIIは、前述したようにCCGGの塩基配列を認識するが、同じ塩基配列を、メチル化非感受性制限酵素MspIも認識するため、好ましく用いられる。

【0087】

そこで、遺伝子切断試行段階では、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、HpaIIで処理する。同時に、同一の遺伝子試料をMspIで処理すると好ましい。これによって、CCGG塩基配列が切断されるというポジティブコントロールを得ることができる。

【0088】

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、先に、SHP1遺伝子の塩基配列（配列番号1および2、図1～図10および図11～図20参照）から、HpaII/MspIの認識部位（CCGG）を挟んでPCR用のプライマーを設定する。具体的には、例えば、後述する実施例1や実施例2に示すプライマーペアを用いる。

【0089】

上記のようなプライマーを用いて、HpaIIで処理された遺伝子試料に対してPCRを実施し、遺伝子増幅量確認段階で、例えば電気泳動によりPCR産物の増幅量を確認する。遺伝子試料中に、メチル化されたSHP1遺伝子があれば、HpaIIは切断できないので、PCRにより目的のサイズのPCR産物が検出できる。一方、メチル化されたSHP1遺伝子が無ければ、HpaIIによりDNAが切断されPCR産物は検出できない。

【0090】

このように、上記制限酵素確認法を用いれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の切断を試み、さらにPCRを用いて増幅してから、得られるPCR産物の増幅量を確認することができる。それゆえ、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても迅速に高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0091】

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、他の工程（プロセス）や他の段階（ステップ）が含まれていてもよいことは言うまでも無い。例えば、SHP1遺伝子メチル化確認工程において、制限酵素反応やPCR反応を円滑に進めるために、得られた遺伝子試料等を精製する精製段階が含まれていてもよい。

【0092】

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための検出キットが含まれる。具体的には、前記SHP1抗体、前記メチル化感受性制限酵素、前記各プライマー、前記SHP1遺伝子陽性およびメチル化陰性対照DNA等を含む構成

を挙げることができる。特に、(1) 上記 S H P 1 抗体、および (2) メチル化感受性制限酵素と、P C R 用プライマーと、前記 S H P 1 遺伝子陽性およびメチル化陰性対照 D N A との組み合わせに分けた場合には、(1) および (2) の少なくとも一方が含まれていると好ましい。また、S H P 1 遺伝子産物定量工程と S H P 1 遺伝子メチル化確認工程の順番はどちらが先であっても良い。

【 0 0 9 3 】

さらに、上記検出キットには、必要に応じて、他の各種試薬類が含まれていてもよい。例えば、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等の P C R 反応用試薬、および、バッファー等の制限酵素反応用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

【 0 0 9 4 】

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、蛋白質定量法の場合、酵素抗体法およびウエスタンブロッティング法の何れであっても、S H P 1 抗体およびその検出試薬が少なくとも用いられる。また、m R N A 定量法の場合、R T - P C R 法や r e a l t i m e R T - P C R 法を用いる場合、S H P 1 c D N A 検出用プライマーおよび T a q D N A ポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。

【 0 0 9 5 】

次に、本実施の形態における S H P 1 遺伝子メチル化確認工程では、メチル化感受性制限酵素によりメチル化を確認するため、まず、遺伝子切断試行段階にて、メチル化感受性制限酵素、メチル化非感受性制限酵素、およびこれらの反応試薬が少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅試行段階では、プライマー、T a q D N A ポリメラーゼ反応試薬、システム検討用 S H P 1 遺伝子メチル化陽性 D N A が少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅量確認段階では、S H P 1 遺伝子メチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A を用いた反応産物を電気泳動のコントロールとして少なくとも使用することができる。

【 0 0 9 6 】

このように、本発明にかかる検出キットでは、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

【 0 0 9 7 】

〔実施の形態 2〕

本発明における実施の他の形態について図 2 5 ないし図 4 7 に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。また、説明の便宜上、実施の形態 1 と重複する説明は適宜省略する。

【 0 0 9 8 】

前記実施の形態 1 では、S H P 1 遺伝子メチル化確認工程に、メチル化感受性制限酵素を用いる制限酵素確認法を用いたが、本発明は、これに限定されるものではなく、本実施の形態では、例えば、遺伝子修飾段階とメチル化シトシン含有判定段階とを含む、重亜硫酸塩を用いて D N A を修飾する方法（以下、説明の便宜上、D N A 修飾法と称する）を好適に用いることができる。

【 0 0 9 9 】

D N A を重亜硫酸塩 ( B i s u l f i t e ) で処理すると、シトシンはウラシルに変換される。具体的には、図 2 5 に示すように、シトシンが重亜硫酸塩によりスルホン化 ( S u l p h o n a t i o n ) され、さらに加水分解により脱アミノ化 ( H y d r o l y t i c d e a m i n a t i o n ) され、さらに、アルカリ存在下での脱スルホン化 ( A l k a l i d e s u l p h o n a t i o n ) により、ウラシルに変換される。このウラシルは P C R 後、チミンに置き変わる。これに対して、メチル化されたシトシン ( 5 ' - メチルシトシン ) は重亜硫酸塩によって変換されない。そこで、本実施の形態では、この重亜硫酸塩処理後の塩基配列の違いを利用して、後述するように、S H P 1 遺伝子のメチル化の有無を検出する。



## 【 0 1 0 0 】

次に、本実施の形態における S H P 1 遺伝子メチル化確認工程、すなわち D N A 修飾法による S H P 1 遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

## 【 0 1 0 1 】

まず、遺伝子修飾段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を重亜硫酸塩で処理する。この段階では、上述したように、メチル化されていないシトシンのみがウラシルに変換されるので、例えば、それゆえ、D N A を重亜硫酸塩処理すると、図 2 6 に示すように、メチル化された（図中円で囲んだ M で示す）シトシンはシトシンのままで残存するが、メチル化されていないシトシンはウラシル（U）に変換される。

## 【 0 1 0 2 】

上記遺伝子修飾段階で用いられる重亜硫酸塩としては、特に限定されるものではないが、例えば、重亜硫酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、メタ重亜硫酸ナトリウム、二亜硫酸ナトリウムまたはピロ亜硫酸ナトリウムともいう）を好適に用いることができる。さらに、重亜硫酸化合物とともに尿素が併用されてもよい。

## 【 0 1 0 3 】

次に、メチル化シトシン含有判定段階として、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する。重亜硫酸塩処理物中の S H P 1 遺伝子にシトシンが含まれているということは、処理前の S H P 1 遺伝子には、メチル化されたシトシンが含まれていることになる。それゆえ、シトシンが存在すれば、元の検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

## 【 0 1 0 4 】

上記メチル化シトシン含有判定段階で実施される、S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する方法としては特に限定されるものではないが、具体的には、1）メチル化シトシンを P C R により検出する方法、2）メチル化シトシンを遺伝子の塩基配列の決定により検出する方法、または、3）メチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかの手法を好ましく用いることができる。

## 【 0 1 0 5 】

より具体的には、まず、1）メチル化シトシンを P C R により検出する方法としては、メチル化特異的 P C R（M e t h y l a t i o n S p e c i f i c P C R）を挙げることができる。

## 【 0 1 0 6 】

上記メチル化特異的 P C R 法は、メチル化された D N A に特異的かつ C G 配列を含む塩基配列をプライマーとして設定する。メチル化されたシトシンが存在していれば P C R により増幅が可能となり、それゆえメチル化された S H P 1 遺伝子を検出することができる。

## 【 0 1 0 7 】

上記メチル化特異的 P C R 法は、従来公知の方法（例えば、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 93, 9821-9826, (1996) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、D N A の精製過程ではエタノール沈澱法や G l a s s b e a d s 法を用いた方法等を用いることができ、また、蛍光ラベルしたプライマーを用いれば、P C R の検出を容易にすることができる。

## 【 0 1 0 8 】

次に、2）遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、すなわち S H P 1 遺伝子のシーケンシングでは、C G 配列を含まない領域にプライマーを設定し P C R を実施する。得られる P C R 産物の中には、メチル化をされているもの（C G 配列のままで存在）とメチル化されていないもの（T G 配列に変換されている）が含まれている可能性がある。これをシーケンシングすることにより、C G 配列すなわちメチル化の存在を検討する。

## 【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

上記 S H P 1 遺伝子のシークエンシングも、従来公知の方法（例えば、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89, 1827-1831 (1992) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、上記プライマーとしては、メチル化された D N A に特異的な配列（C G 配列を含む）を有するプライマーを用いることも可能である。

#### 【 0 1 1 0 】

この方法も P C R を用いているので、検体試料から微量の S H P 1 遺伝子さえ得られれば、S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。また、シークエンシングを利用することにより具体的な配列を決定するので、メチル化の程度をより明確化することも可能となる。

#### 【 0 1 1 1 】

次に、3) シトシンを含む塩基配列を識別する方法としては、M s - S n u P E 法、重亜硫酸塩 S S C P 法、メチルライト法、蛍光溶解曲線分析法、C O B R A 法等を挙げることができる。

#### 【 0 1 1 2 】

上記 M s - S n u P E ( M e t h y l a t i o n - s e n s i t i v e S i n g l e N u c l e o t i d e P r i m e r E x t e n s i o n ) 法は、メチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法である。ただし、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らないので、検出したい C G 配列に隣接するポリヌクレオチドを作成し P C R 産物とアニールさせる。放射性同位元素の存在下で D N A を合成した時に、 $^{32}\text{P}$ -d C T P を取り込めば、そこは C G 配列であるためメチル化されているシトシンが存在することになる。一方、D N A を合成した時に、 $^{32}\text{P}$ -d T T P を取り込めば、そこは T G 配列であるためメチル化はされていないことになる。

#### 【 0 1 1 3 】

上記 M s - S n u P E 法は、従来公知の方法（例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 25, 2529-2531, (1997) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

#### 【 0 1 1 4 】

上記重亜硫酸塩 S S C P ( B i s u l f i t e - S S C P ) 法も、メチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、P C R 産物を 1 本鎖 D N A に変性後、S S C P ( S i n g l e S t r a n d C o n f o r m a t i o n a l P o l y m o r p h i s m ) 法を用いて電気泳動し、1 本鎖 D N A の移動度の違いから、S H P 1 遺伝子のメチル化の程度を判定する。

#### 【 0 1 1 5 】

上記重亜硫酸塩 S S C P 法も、従来公知の方法（例えば、E l e c t r o p h o r e s i s 21, 904-908, (2000) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

#### 【 0 1 1 6 】

他に、メチルライト ( M e t h y l - l i g h t ) 法や、蛍光溶解曲線分析 ( F l u o r e s c e n c e M e l t i n g C u r v e A n a l y s i s ) 法等も挙げられる。これら方法も、何れもメチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、内側の調べたい領域について、メチル化特異的なポリヌクレオチドを作成し、このメチル化特異的ポリヌクレオチドが 1 本鎖にした P C R 産物とどの程度アニール ( 2 本鎖重合 ) 反応するかを検討することにより、上記 P C R 産物中のメチル化の量を判定する。

## 【 0 1 1 7 】

上記メチルライト法は、具体的には、例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 28 ( 8 ) , E 3 2 , ( 2 0 0 0 ) 等の文献に開示されている方法を、上記蛍光溶解曲線分析は、具体的には、例えば、C l i n i c a l C h e m i s t r y 47 , 1 1 8 3 - 1 1 8 9 , ( 2 0 0 1 ) 等の文献に開示されている方法を好適に用いることができる。

## 【 0 1 1 8 】

上述した各方法は、P C Rを用いているので、検体試料から微量のS H P 1遺伝子さえ得られれば、S H P 1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

## 【 0 1 1 9 】

上記C O B R A法 ( C o m b i n e d B i s u l f i t e R e s t r i c t i o n A n a l y s i s、あるいは、B i s u l f i t e P C R f o l l o w e d b y r e s t r i c t i o n a n a l y s i s等とも称される) では、例えば、C G C G配列がメチル化を受けていると、重亜硫酸処理後もC G C G配列のままに残存するが、メチル化されていないとT G T G配列に変換される。そこで、上記C G C G配列のみを切断する制限酵素等を利用することで、電気泳動ゲル上のバンドパターンを解析して、S H P 1遺伝子のメチル化の有無を判定および定量化することができる。

## 【 0 1 2 0 】

上記C O B R A法も、従来公知の方法 (例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 25 , 2 5 3 2 - 2 5 3 4 , ( 1 9 9 7 ) 等の文献に開示されている方法) を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。勿論、この方法でもP C Rが用いられるので、上述したP C Rによる利点を得られるだけでなく、制限酵素処理と電気泳動とを用いるので、バンドパターンの解析さえ明確化しておれば、容易にS H P 1遺伝子のメチル化を確認することができるという利点もある。

## 【 0 1 2 1 】

このように、本実施の形態におけるD N A修飾法では、メチル化シトシン含有判定段階でP C Rを用いているが、このP C Rで用いるプライマーの設計方法について以下に説明する。

## 【 0 1 2 2 】

上述したように、D N Aを重亜硫酸塩処理するとシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されずに保存される。ここで、細胞内でメチル化を受ける可能性のあるシトシンは、5'配列側からC Gと並ぶC G配列 ( 5' - C G - 3' ) のシトシン ( C ) のみである。そのため、重亜硫酸塩処理により、上記C G配列以外のシトシンは全てチミン ( T ) に変換されてしまう。そこで、全てのC G配列がメチル化を受けたものとしてS H P 1遺伝子の塩基配列を変換し、プライマーを設定する。なお、D N A中のウラシルはチミンとして認識され、P C Rによりチミンに置換されることになる。

## 【 0 1 2 3 】

まず、プライマーを計画するD N A鎖に関する条件を設定する。S H P 1遺伝子の塩基配列において、センス鎖またはアンチセンス鎖の何れも、上記C G配列のみがメチル化を受けたとして、その他の塩基配列におけるシトシンが全てチミンに変換された配列を想定する。

## 【 0 1 2 4 】

具体的には、図27～図36および配列番号5に示す塩基配列が、図1～図10および配列番号1に示すS H P 1遺伝子のゲノムD N A ( ワイルドタイプ ) のセンス鎖に対応する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列 ( 以下、説明の便宜上、センス鎖変換配列とする ) であり、図37～図46および配列番号6に示す塩基配列が、図11～図20および配列番号2に示すS H P 1遺伝子のゲノムD N A ( ワイルドタイプ ) のアンチセンス鎖と対応

20

30

40

50

する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列（以下、説明の便宜上、アンチセンス鎖変換配列とする）である。これらセンス鎖変換配列とアンチセンス鎖変換配列とは、重亜硫酸塩処理により相補的ではなくなる。

【 0 1 2 5 】

なお、図 2 7 ～ 図 3 6 および配列番号 5、並びに、図 3 7 ～ 図 4 6 および配列番号 6 の塩基配列は、C G 配列が 1 0 0 % メチル化されていると想定した場合に、重亜硫酸塩処理を受けたものとしての塩基配列であり、実際には細胞中で 1 0 0 % のメチル化が生じるとは考えられないため、本発明において検出し得る可能性としての塩基配列として例示する。

【 0 1 2 6 】

そして、( I ) 上記センス鎖変換配列に対して、フォワードプライマー ( F W プライマー ) およびリバースプライマー ( R V プライマー ) を作成するか、あるいは、( I I ) 上記アンチセンス鎖変換配列に対して、F W プライマーおよび R V プライマーを作成する。この場合、同じ場所でもプライマー配列はそれぞれ異なる。 10

【 0 1 2 7 】

次に、プライマーを計画する領域に関する条件を設定する。( i ) メチル化された D N A のみを直接 P C R で増幅するために、C G 配列を含む塩基配列に対してプライマーを作成するか、( i i ) メチル化されたもの、されていないものを区別なく P C R で増幅するために、C G 領域を含まない配列に対してプライマーを作成する。なお、( i i ) の場合は、後でシーケンシングかその他の方法を実施し、メチル化を判定する。

【 0 1 2 8 】

したがって、D N A 修飾法で用いられるプライマーの設計には、上記 D N A 鎖に関する条件 ( I ) および条件 ( I I ) と、領域に関する条件 ( i ) および条件 ( i i ) とを掛け合わせた 4 通りの設計方法がある。 20

【 0 1 2 9 】

ここで、( i ) の場合、プライマーの場所が都合良くメチル化を受けていれば検出されるが、その場所ではなく近隣領域のみメチル化を受けているような場合には、メチル化が存在するのにも関わらず検出不可能となる。そこで、( i i ) のように、メチル化の有無に関わらず P C R で増幅後、各プライマーに囲まれた領域内のメチル化、すなわち C G 配列の有無を検定することで、確実に S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、本実施の形態における S H P 1 遺伝子のメチル化の判定には、検出用のプライマーの場所のみならず、遺伝子配列の情報そのものが重要となる。 30

【 0 1 3 0 】

また、C G 配列がメチル化されていないと、重亜硫酸塩処理により T G 配列に変換されるが、この T G 配列を含む塩基配列に対して作成されるプライマー ( U n m e t h y l a t e d p r i m e r ) は、メチル化を受けていない D N A の存在を証明するコントロールとして用いることができる。また、重亜硫酸塩処理が不十分な場合には、シトシンがウラシルに変換されていないワイルドタイプの S H P 1 遺伝子が混入することになる。そこで、重亜硫酸塩処理が十分完全になされたか否かのコントロールとして、ワイルドタイプの塩基配列を有するプライマー ( W i l d t y p e p r i m e r ) を用いることができる。 40

【 0 1 3 1 】

なお、上述したメチル化シトシン含有判定段階では、P C R により増幅された遺伝子の確認に、前記実施の形態 1 における遺伝子増幅量確認段階と同様の方法、例えば、電気泳動法を用いてマーカと比較することにより遺伝子の増幅量を確認したり、さらに電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングしたりする手法が挙げられる。勿論、これら手法に限定されるものではなく、また、上記電気泳動法やブロッティングの方法についても従来公知の手法を好適に用いることができ、特に限定されるものではない。

【 0 1 3 2 】

換言すれば、本実施の形態における D N A 修飾法による S H P 1 遺伝子メチル化確認工程 50

でも、前記実施の形態 1 における制限酵素確認法による場合と同様、遺伝子増幅量確認段階が含まれていても良い。

【 0 1 3 3 】

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

【 0 1 3 4 】

まず、SHP1 遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれる SHP1 蛋白質および SHP1 mRNA の少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量された SHP1 蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんど SHP1 遺伝子産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

10

【 0 1 3 5 】

次に、SHP1 遺伝子メチル化確認工程で、前記 DNA 修飾法により、検体試料から調製した遺伝子試料中の SHP1 遺伝子の塩基配列中に含まれる CpG 島のメチル化を確認する。具体的には、遺伝子修飾段階にて、例えば重亜硫酸ナトリウムを用いて、上記検体試料から得られた遺伝子試料をで処理する。

【 0 1 3 6 】

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、前述したプライマーの設計方法に基づいて、PCR 用のプライマーを設定する。

【 0 1 3 7 】

具体的には、メチル化特異的 PCR では、図 47 (a) に示すように、例えば、23 塩基対のワイルドタイプ DNA (図中上がセンス鎖で下がアンチセンス鎖) を想定し、ワイルドタイプ DNA の CG 配列に 100% メチル化があるとする。この場合、重亜硫酸塩処理すると、図 47 (b) に示すように、センス鎖とアンチセンス鎖は相補的ではなくなる。そこで、図 47 (c) または (d) に示すように、センス鎖またはアンチセンス鎖に対して FW プライマーおよび RV プライマーを作成する。

20

【 0 1 3 8 】

なお、上記メチル化特定 PCR においては、PCR 用プライマーとして、具体的には、例えば、後述する実施例 4 や実施例 5 に示すプライマーペアを用いる。上記のようなプライマーを用いて、重亜硫酸ナトリウムで処理された遺伝子試料に対してメチル化特異的 PCR を実施し、例えば電気泳動により PCR 産物の増幅量を確認する。

30

【 0 1 3 9 】

このように、上記 DNA 修飾法を用いれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後の SHP1 遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、SHP1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、単純なメカニズムで迅速かつ高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 1 4 0 】

次に、SHP1 遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれる SHP1 蛋白質および SHP1 mRNA の少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量された SHP1 遺伝子産物が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんど発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

40

【 0 1 4 1 】

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、前記実施の形態 1 の検出方法と同様に、他の工程 (プロセス) や他の段階 (ステップ) が含まれていてもよいことは言うまでも無い。

【 0 1 4 2 】

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための検出キットが含まれる。具体的には、遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と前記

50

プライマー、および前記SHP1抗体を含む構成を挙げることができる。つまり、本発明にかかる検出キットでは、上記重亜硫酸塩、プライマー、およびSHP1抗体を、(1) 上記SHP1抗体、(2) 重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および(3) 配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーに分けた場合、(1)、(2)および(3)のうち、少なくとも何れか一つを含むことが好ましい。

#### 【0143】

さらに、上記検出キットには、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つノーザンブロットング用プローブ、または、シトシンを含む塩基配列を認識する制限酵素およびSHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAを用いた電気泳動用マーカーが含まれていてもよく、さらには、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等のPCR反应用試薬、および、バッファー等の制限酵素反应用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

#### 【0144】

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、前記実施の形態1で例に挙げたものと同様であるのでその説明は省略する。

#### 【0145】

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程では、重亜硫酸塩処理によりメチル化を確認するため、まず、遺伝子修飾段階にて、各種重亜硫酸塩等の試薬が少なくとも用いられる。次に、メチル化シトシン含有判定段階では、メチル化シトシンをPCRにより検出する方法を用いる場合には、メチル化配列特異的プライマー、およびTaq DNAポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。また、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、あるいはシトシンを含む塩基配列を認識する方法では、各具体的な方法に応じて公知の試薬類を用いる。

#### 【0146】

このように、本実施の形態にかかる検出キットでも、前記実施の形態1の検出キットと同様、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

#### 【0147】

なお、本発明は、上述した各実施の形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施の形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施の形態についても、本発明の技術的範囲に含まれることはいうまでもない。

#### 【0148】

##### 【実施例】

以下、図48ないし図52に基づいて、本発明の具体的な実施例について説明する。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0149】

##### 【実施例1】

ナチュラルキラー細胞リンパ腫を含む検体試料を用い、Towbin H. et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, (1979)に開示されている方法にしたがってウエスタンブロットングを実施した。なお、SHP1抗体として#SH-P TP1 (D-11) : sc7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた (SHP1遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法)。

#### 【0150】

10

20

30

40

50

その後、SHP1 遺伝子メチル化確認工程に移行した。まず、メチル化感受性制限酵素としてHpaIIを用いて、上記検体試料から調製した遺伝子試料を37℃4時間で処理した（遺伝子切断試行段階）。

【0151】

次に、HpaIIで処理した遺伝子試料をPCRで増幅した（遺伝子増幅試行段階）。このとき用いたプライマーペアは、配列番号7および図48（a）に示す19塩基のプライマーREP-S1と、配列番号8および図48（b）に示す20塩基のプライマーREP-AS1との組み合わせとした。このプライマーペアを用いた場合、配列番号9および図48（c）に示すように、SHP1 遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、7441塩基から7566塩基までの126塩基の塩基配列が検出される。

【0152】

なお、図48（c）におけるカッコ内の「#（番号）」は、上記SHP1 遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S1およびREP-AS1の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS1は、上記REP-AS1の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0153】

その後、アガロースゲルで電気泳動してから、得られたDNAバンドをナイロンメンブレンにブロッティングしてSHP1 遺伝子の増幅を確認した（遺伝子増幅量確認工程）。

【0154】

次に、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76, 4350, (1979)に開示されている方法にしたがってウエスタンブロッティングを実施した。なお、SHP1 抗体として#SH-P TP1 (D-11): sc 7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた（SHP1 遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法）。

【0155】

上記SHP1 遺伝子メチル化確認工程とSHP1 遺伝子産物定量工程との結果から検体試料中の造血器腫瘍細胞を検出した。

【0156】

〔実施例2〕

遺伝子増幅試行段階で、プライマーペアとして、配列番号10および図49（a）に示す21塩基のプライマーREP-S2と、配列番号11および図49（b）に示す21塩基のプライマーREP-AS2との組み合わせを用いた以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検出した。

【0157】

上記プライマーペアを用いた場合、配列番号12および図49（c）に示すように、SHP1 遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、6858塩基から7084塩基までの227塩基の塩基配列を検出することができる。

【0158】

なお、図49（c）におけるカッコ内の「#（番号）」も、上記SHP1 遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S2およびREP-AS2の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS2は、上記REP-AS2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0159】

〔実施例3〕

RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1 遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。

【0160】

10

20

30

40

50

すなわち、前記検体試料から全細胞内のRNAを調製してから逆転写酵素により逆転写した。その後、SHP1特異的プライマーペアを用いてPCRにより増幅した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配列番号13および図50(a)に示す23塩基のプライマーSHP-PF1と、配列番号14および図50(b)に示す25塩基のプライマーSHP-PR1との組み合わせを用いた。

【0161】

〔実施例4〕

real time RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例3（すなわち前記実施例1）と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配列番号15および図51(a)に示す20塩基のプライマーSHP-LF1と、配列番号16および図51(b)に示す20塩基のプライマーSHP-LR1を用いた。

【0162】

〔実施例5〕

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9821-9826, (1996) に開示されている方法にしたがってメチル化特異的PCRを用いてSHP1遺伝子メチル化確認工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。なお、重亜硫酸塩としては、重亜硫酸ナトリウムを用いた。

【0163】

また、上記メチル化特異的PCRにおけるプライマーペアとしては、配列番号17および図52(a)に示す24塩基のプライマーMF2と、配列番号18および図52(b)に示す21塩基のプライマーMR2との組み合わせを用いることができる。このプライマーペアを用いた場合、配列番号19および図52(c)に示すように、SHP1遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、7037塩基から7195塩基までの159塩基の塩基配列を検出することができる。

【0164】

なお、図52(c)におけるカッコ内の「#（番号）」は、上記SHP1遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーMF2およびMR2の対応位置を示している。ただし、上記各プライマーはメチル化されているDNAのみを検出できるように設計されているので、その塩基配列は、上記下線部の塩基配列とは少し異なっている。また、プライマーMR2は、上記MR2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0165】

〔実施例6〕

検体試料として、診断用の骨髄(BM)検体と、ALL（急性リンパ芽球性白血病）患者の末梢血(PB)検体とを用いた。ALL患者から得られたBM検体は少なくとも70%の比で芽細胞を含んでいた。また、これら検体試料に対する対照試料は、化学療法によって達成された血液学的完全寛解の後に得られた。

【0166】

上記検体試料を用いてマイクロサテライト解析を行った。このときのPCR反応では、5'側のプライマーを、5'-iodoacatamide fluoresceinでラベルし、反応系は、10 pmolのそれぞれのプライマー、40 ngのゲノムDNA、1×PCRバッファー、200 μMのそれぞれのdNTPと、0.5 unitのTaq DNA polymeraseを含む20 μlの系とした。得られたPCR産物は、ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) にかき、Genescan Analysis software ver 3.7 (Applied Biosystems) で解析を行った。

【0167】

10

20

30

40

50



その結果、図 5 3 ( a ) ・ ( b ) に示すように、D 1 2 S 3 3 6 マーカーおよび D 1 2 S 3 5 6 マーカーによって S H P 1 遺伝子の L O H の有無を確認できることがわかった。本実施例の結果では、これらマーカーのうちテロメア側の D 1 2 S 3 5 6 マーカーでは、有意な結果が得られた 1 9 症例中 1 5 例 ( 7 9 % ) に L O H が認められた。また、セントロメア側の D 1 2 S 3 3 6 マーカーでは、1 6 症例中 6 例 ( 3 8 % ) に L O H が認められた。

#### 【 0 1 6 8 】

上記何れの実施例の結果も、検体試料から十分に造血器腫瘍細胞を検出することができた。それゆえ、本発明は、複数の診断手法を併用しなくても造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができることがわかった。

10

#### 【 0 1 6 9 】

##### 【発明の効果】

以上のように、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、造血器細胞を含む検体試料に含まれる、造血器細胞に特異的な S H P 1 蛋白質およびその m R N A の少なくとも一方を定量する S H P 1 遺伝子産物定量工程と、上記検体試料から得られる、上記 S H P 1 蛋白質をコードする S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する S H P 1 遺伝子メチル化確認工程と、上記検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失 ( L O H ) の有無を確認する S H P 1 遺伝子 L O H 確認工程とを含む方法である。

#### 【 0 1 7 0 】

また、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい一例としては、( 1 ) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、および ( 2 ) シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅する P C R 用のプライマーと、上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照 D N A とのうち、少なくとも一方を含む構成か、あるいは、( 1 ) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、( 2 ) 遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および ( 3 ) 配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含む構成か、または、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーを含む構成を挙げることができる。

20

30

#### 【 0 1 7 1 】

本発明の方法または構成によれば、S H P 1 遺伝子の発現を、遺伝子 D N A の修飾と m R N A と蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、S H P 1 遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を 4 段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。よって、本発明を用いることで、造血器細胞を含む微量の検体試料から造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができる。

40

#### 【 0 1 7 2 】

それゆえ、本発明における悪性リンパ腫・白血病の高感度検出法を用いると、一般集団検診による造血器腫瘍の早期発見、診断および治療後のモニタリングや再発の早期発見が可能になり、これら疾患を発症した家族等血縁者における発症危険度の予測等に本発明を利用することも可能となる。その結果、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となるという効果を奏する。

#### 【 0 1 7 3 】

##### 【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Hematopoietic malignant cell-d  
lignant cell-detection kit

<130> Y2002-P331

&lt;160&gt; 19

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2. 1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 18404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; genomic DNA

&lt;400&gt; 1

ccatctagtt	gtgcccagtg	tagaccaaat	gtc
ctgcatgcgt	cctgttttggc	aaacagctgc	cca
actaccaccc	cctccagggtg	tcttaggcac	gct
actccctctt	gcagggtgtcc	ttaagttttgc	tcg
tcctgagatc	gccagcctgt	caggcaagct	gaa
gccaccccat	gggcctgctg	ctggtggcag	cgt
ttgtgccact	gccagggggag	gaaaggcctt	gat
gacttagcct	tggtgtcagt	ctcttgcgga	cct
tccctctgcc	tttccaggcc	ccatccccct	gaa
cctaaccctg	ccccaggggcc	taaccctacc	tga
tgagaggctg	gagtgggtcc	ctcagcgccc	tgg
ccttctctga	ggaactgggc	tgttagggat	ttt
gagagggtttc	ccccattggt	tgctcttcct	cag
tacccaatac	cccgccgctc	tgtcagcttg	agc
ctctcccggg	ggaaggcggc	cctggaccag	cag
gctgcaggga	agctggccgc	tgtgggcggt	ctc

20

30

40

tcctggagac tattagacca gggttigicc ctgcagigcc attggccctgg caggcaggat 1020

c g a g g a g g a a	g t g g c t g a t t	a c t g a g c g g t	t c t
c a g c t g t g c c	g c t g g c t c a g	c c c c g c c c c c	t g c
t a c a g a g a g a	t g c t g t c c c g	t g g g t a a g t c	c c g
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g c t t t g t t g a	t g c
c g a t c t g c c g	c t g c c c t g c g	c c t g t t t c c g	g t c
g t g a g g a c c c	c c g g c t c a c t	c a t g c t c c t c	t g c
a g t g t g t a t c	t g t t c t c t c c	a t t g c a t t t c	t a c
c t c c t g c t t a	g g a c c t g t c c	c c c t g g g t a g	c t c
g c c a c c c g c g	a a g g c c c t c c	c a c g t c c a g c	c a a
t t g g t c c c a t	c t t c t t t g t t	t c c t t t c a c t	t c c
g t a c g t g t t g	a g c a t c t a t t	a t g c a c c a g g	t g c
g a a c a a g a c a	g a c a t g g t c t	c t g c t c t c a c	g g a
c c g a a c a a a t	a a c c c a a t a a	a t t g g a t c a t	t g c
t a g a c a g c c t	t g g c c g g g t g	t a g t g g t t c a	c a c
a g g c g a g a g g	a t t g c t t g a g	c c c a g g a g t t	t g a
c t g t c t c t a c	a a a a a a t a a g	a a a t t a g c t g	g g t
c t a t g g a g a g	g c t a a g g t g a	g a g g c t t g c t	t g a
g a t g a t t g c a	c c a c t g c a c a	c c a g c c t g g g	c g a
a a a a a a a a a a	g a a a a t g a a c	c a g c t t c a t a	t g c
a t t a c t a g c t	g g a g g g a t c a	g g g a g g c c t t	c c c
g g a t g a g g a g	g a a g a g g a g c	t g g c c a t g t g	a c g
g c a g a g g a g a	t g g t g a g c a c	a a a g c c c t a a	t g t
c c c g t g g c a g	a g g a c c c t a g	t g g a g c g g a g	g c a
a g c t a g g a t g	t t g a a a g t g a	a a a c c t g a c g	a g a
c a c t t t g g g a	g g c c g a a g g g	g g a a g a t t g c	t t g
c a a c a t a g a g	a g a c c c c a t c	t c t a t t a a a a	a a a
t g g t a g t c c t	a g c a g t t t g g	g a g g c t g a g g	t g g
g a c c a c c c t g	g g c a a c a t a g	g g a g a g a c c t	c a t

10

20

30

40

tactaataaaa tagctggatg tagtggcatg caccigtggt ctcagttact tggaaggctg 2760

aggcaggagg	atcacctgag	ccaaggagggt	cga	
gcacttcagc	ctgggtgata	aagcaagatt	ctg	
gaaggaaaga	aggaaggga	ggaagaaaga	aaa	
cgagaaagaa	gaaagaaaaag	gaagggaaggga	aag	
aagtgacacc	cagtcgaaag	aagaaaggga	aga	
gaaaaaagaa	aaagtgacaa	ccggctggggc	atg	10
ttgggaggcc	gaggcagggtg	gatacagagg	tca	
ggtgaaacc	tgtctcaact	aaagatacaa	aaa	
acctgtgagt	cccagctact	agggagggtg	agg	
ggaggttgca	gtgagccgag	attgcgtcac	tgc	
ctccatctca	aaaaaaaaaaa	aaaaagaaaa	gaa	
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gctccctagc	cct	
ctgccccctgc	cccagtgcac	atcttgtcac	tgt	20
gtcttctggt	ccctgatccc	gtctgtgggtc	att	
ccccctgggtgc	agattttcatc	cttgggtttct	cag	
gggtcccccac	ctctcagaac	aacttttgctc	cag	
tgcccatgtg	gactctgtgc	gtgccacctc	ttt	
gcacttcttc	ctccaccttc	catcatggggc	tgt	
cgctgtctgc	tgcagtatgg	ttgttgggggg	aaa	
cgtgtttttac	ccaccttcct	actcactagc	ttg	30
tgagtccttag	tttctgtttc	taaaattggg	tga	
gaggattaat	agtataaatgt	aaaagctggc	agc	
tcacatcagt	atttgggaaa	tattgtttaag	ctc	
agagcagttc	cagaactttc	tacagattat	ttt	
tcttcttgta	tcaccattga	tcttgatctg	tat	
ggagttttcac	tctgtttgcc	aggctggagt	gcg	
tccacctcct	gagaagctgg	gattacaggc	tag	40
agctgggtctc	gaactcctga	cctcaagtga	tcc	

gattacaggt giaagtcact gcgcccagct giatititiat tttitgagac agggcttcac 4500

t c t g t c a c c c	a g g c c g g a t t	a c a g t g g c a c	a a c
c a g g c t c a a g	c g a t c c t c c c	a t c t c a g t c t	c c c
a c c a c a c c t g	g c t a a a t t t t	g t a t t t t t t g	t a g
c t g c t c t c a a	a c t t g g t g t c	a a g t a a t c c a	c c a
a c a g g c g t g a	g c c a c t g c g c	c t g g c c t t g a	t c t
a a t a t t t t t t	t c t t c t g a a t	t a t c a g g c a t	t t a
t t g t t t c c g c	c c a t a a g a a a	a t g g g g a a a a	t g a
c t a a a t g a g a	t c g t g t a t g t	g a a a g t g a t c	t g c
a g g t a g t t t t	t t a t t t t c c t	g c c a a a g g a t	a g c
g t c t c t t g g c	t t g a c a c c c t	t c a g a g g a a t	t c c
g c c t a g t t a g	t t t c t t c t g g	g t g c c g a g t t	a a t
t g g a a g g a g t	g t c t t g g g g c	c a g g g t g c a g	t g g
a c t t c g t g t g	t g g t c a g a t t	t a t g t t c c a t	g c g
g t g t a g g t g g	a c a t g g a t g a	t g a g g t g t g t	g t g
c g t a t g a c a a	g c a g g c t g t g	t g t g t a g g a c	c a g
g c t a t g g a c t	g a c g a g c t t g	t t t g t t g a a c	a c t
t c t g a a c a c t	c c g a g a t g a g	c g a g a g c g c c	a g c
c a t g t g c t c t	t c t t g c t c c t	t g g c g t t g g g	c g t
g g g g t g g t g t	c c a a g c t g a a	g g g g t a g t c a	a a g
a g a t t c c c c a	g g g c a c c a g t	g a g a g a a g a a	a a c
a a g a a a a g t g	g a a a a g c c t t	t t t t g g g g g a	a a a
a t a a t g t a g t	t a t c a t g g g a	a a a t t a g a c t	t g t
c t g a a g c a g a	a c a t g c a t a a	t g t t c a t a a a	t a t
t t t t t t t t t t	g a a a t a g a g t	c t t a c t g t g t	t g c
g g c t c g c t g c	a a c c t c g g c t	t c c t g g g t t c	a a g
a g c t g g g a t t	a c a g g c g c c c	a c c a c c a t g c	c c a
a g g g g g t t t c	a c c a t g t t g g	c c a g g a t g g t	c t c
c t t g g c c t c c	c a a a g t g c t g	g g a t t a c a g g	c g t

10

20

30

40

tttatacaca cccaigcaaa cagcatccag atagagacaa agagccticc cgtacccta 6240

aaagtttccc	agaaattgtt	cccagtttagc	ata
catcatataa	cattcaaaaa	ggtatgtaga	gaa
cagccacca	gtttccctcc	ctagggggaag	cca
gttgagctgc	ttttccctcgt	tttggttttg	cgg
gtaggcagca	tcatataacct	tagtggtttag	ggc
tcagccatgg	tgaggacctt	gtccccccagc	ccc
ctgggggcagg	gcagagggcct	agggacaaga	att
tcagggtcat	gttgtccatc	cctctgccac	agt
agaggaggggc	acccttctct	cttgcaagca	ttg
tcccatggca	gccccctttgg	acaaggagggc	tct
gctgggtgtat	aggagttcaa	agcactggct	ttg
ggcactgcag	ctgactcact	gatggactca	ggc
ttccttgtct	gtaaaatgat	aaagatagcc	cct
atcagacaag	gcatgtgaac	gccattatag	cac
cgatgacagt	tgtcacccgcc	atcattgttta	tta
gcagctgggtg	gaggaggggag	agatgccgtg	gga
tatctggggcc	tggagtggtgc	aaggcacaca	tgt
gtgcaatgcc	atgctcctga	gccttttgatt	gca
acccccagtg	ccaccctgct	ctgcttctct	tcc
aagtgagttc	ccccaaagggg	tcggccgcgc	ctc
caggccagtg	gagtggcagc	cccagaactg	gga
actgggagct	gcatactgagg	cttagtccct	gag
ctcctcatte	cctgcgcgcc	cttcctctcc	gga
tgccaccac	ggtagacagg	aggcaagggt	gcc
ccctgcctgg	gccgcccagg	tggttttcacc	gag
tgctcaaggg	ccgagggtgtc	cacggtagct	tcc
gtgacttctc	gctctccgtc	aggtagggtgg	gcc
tctcttgtgc	catccaggcc	ctgaaccact	cat

10

20

30

40

ccccgicigt tccctigccc ccaacccccca cactccccat cccigicigt gccacccat 7980

gccccatgtgt	gccccccaccc	aggacctcag	ccg
caccgactgg	cctcaccgcc	tggtgccctg	cag
gatccagaac	tcagggggatt	tctatgacct	gta
agagctgggtg	gagtactaca	ctcagcagca	ggg
catccacctc	aagtacccgc	tgaactgctc	cga
caccccccgcc	attcccaagc	agggatgagc	cgg
gggagactgg	cagccggcgc	tgcctacctt	cca
gctctcaatg	tccctcctcc	ctgctgtcct	ggg
acccttttcca	cctaaccctcg	aggaagccac	aga
ctggcccgctg	caaccacaggt	cccactggag	aca
tcgtgcaggc	cagctctgtt	gttagaaagc	tct
ctccgtctgc	ccctcaccctc	agcacatggt	agg
gatgggggatg	aatgcttgcc	aagacacttg	atg
ggctctgtcct	gtgggggtcaa	ataggctctcc	ggc
gtgaagtgtt	cacctgtgta	aagtgtctca	cgc
gcattttcctt	cctgtggcct	ccccgactcc	tcc
ggctggggggc	tctgaatgct	cctcatgaca	cca
tgccagatcc	ccttagagta	aaggggcagcg	gaa
cctggggccaa	gccgacttgc	ccttgccgtg	gat
atgatcggga	accttgctcc	tgccagcttg	cag
gcatcaatat	tttttggtcaa	ggcactgatt	gaa
agccctgttg	cccacctggg	aggcctcctt	tcc
tctctctgtg	agcctcacat	ggctggctcc	gtg
ccgcaaacact	caggggggctt	ttgggcaccga	gac
ccttgccctcc	agccaggaga	ggaggacggg	ctg
gcaggggcccc	aggaggcccc	tgccagaggag	gct
agagagagaaa	ggaaggaggagg	gcagtgccgg	ggc
tgagaggccct	tttggggtgac	ccgtcccagg	agc

10

20

30

40



gigagaggct ctctctccca ggtctgctg igtctctgc ctgtctgtg cgctctctcc 9720

t c t g c g a g a a	t t t g c a t c t g	t c c c t c g g t g	g c t
t t g c a t g g a g	a c t t c c t c a t	c c t g g g g c c t	g a g
c c t g g g g t c c	t a g c c t g t c c	c c a g g c g g t g	g g c
t c t g g g g g t c	t c t c g g c t g g	a g t c a c c t c c	g g g
g g t c c t c c c c	t c c t t c c c c c	c a t c c c t g c g	g t t
c c t g g g c t g a	g g a a a c c t c a	c a a c c t c a c t	t c t
t t t t t t c c a t	c a c g t g g t t t	c c t g t g g g g c	t g g
g g a a a g g g g t	g t g c t t c g g g	g a a a g g g c t t	a g t
a a a t c c g t t t	g a a c c c t g g g	c t c c c c t t c a	g t g
c t a c a c c a c t	c t t t c c c c a g	t g g g g t t g t c	t t c
t c c g c c t t c c	t t g t g a c t t g	a g t c t g t g t g	t c c
c t c g g t c t g c	g t t t c t c t t t	g c c t c t g g t c	t c t
a g a t t c a t c c	t t a g c t t c t c	t c c t c c a a a t	a t t
c a g a g g t g g g	c t c t g g g t t c	g a a g c c c g g t	t a g
c t g g g a g g t c	g a g g c t g c a g	a g a g c t g t a a	c c g
g a g c t c t g g a	a g c t t g c c c t	a g a g t c a g t c	a a g
g c g t c a g t t t	c c t c a t c t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a c c t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g c t t g a	t t t c c g g c c c	c t c t c t g t g a	a t g
c t g g g t c t t a	c c t t c c c t g a	c g c t g c c t t c	t c t
g g g c a g g c a g	a g a c g c t g c t	g c a g g c c a a g	g g c
a g c c t c a g c c	a g c c t g g a g a	c t t c g t g c t t	t c t
c c a g g c t c c c	c g c t c a g g g t	c a c c c a c a t c	a a g
g g c g g g g g a g	c c t c t g c t g a	g g c t c c t g t c	t g t
c t g c c t g g g c	t t g a a t t c a a	g g c t g g g g a c	c c a
g c c t a a t t t g	g c t c c c c c c a	g g g t g g a c g c	t a c
a g c c t c a c g g	a c c t g g t g g a	g c a t t t c a a g	a a g
t t t g t c t a c c	t g c g g c a g g t	c a g g g g t g g g	c c c

10

20

30

40

```

tccccagat gtagcttct gggatctctg agttgctgac ttctgctct tcccccccc 11460
agccgtacta tgccacgagg gtgaatgcgg ctg
acaagaagca ggagtccgag gatacagcca agg
atggtgggga ccgggcagggc tgggggcagct gag
cggacacctt cccctccttg cccacctctg ctc
atggatgccc tcttttgggag ctgatgctca ttt
agcaggagggt gaagaacttg caccagcgtc tgg
agaaccgcta caagaacatt ctccccctgtg agc
accgccccctg ccccagctgc ctccccctcat ctc
ggggccatctc cccacaccccc ccacagagcc tcc
ccagaagtgc ctccccacca ccagcaggca ggt
actccctcac tccctccata cagatgatcc ccc
gcctcatggc ttctgagacc agaattggcct gtt
gtgagtcctt ggctaaccaca gaccatctctg cct
agccgagtgat tcctgcagggg acggggacagt aac
aactacatca aggtcagcag tgtggggccac gtg
cctgtcttggg gggggggaccc tagatccaga gac
tgcatggggtg aggggtggcag tgggttcagggg cct
gggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc
agacctacat cgccagccag ggttgtcttg agg
cgtggcaggga gaacagccgt gtcatcgtca tga
taggggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg
gagcagtcag atgccaggggc agaaagggat ctc
aaactgagggt ctagtgacaa agtctcgact aca
atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt
ctgccccacc tgtctgcatc caggccccctc ctg
agtctgcccc ttaccctgca ggctccccctt aca
gatcccatcc gtgacacaaa ctggggtcaag ttc
tcctgggtcac ctttggggata aagtcgcact cta

```

10

20

30

40

```

tccctctgac ccgcacgctt ctctgaagg ctacccgccc ccagcagccc cagctcttcc 13200
agggttcccag ccttttcttttg cacaagctca ttt
tatctcttgcc tggcagatgc ctcgttttttg aag
gaatccagggt cttgttttcct ccaggaccta gag
tcctcagcgc ggtgtctccc ccgggtcacct gtc
acagactggg tgttattttgt gtctgtgaag ctg
gcctgcccctg gcaacgttttg ttgaatgaca aac
gcctcaccac ctgtttggtgg ttgatctgag acg
agcccatccg tccatccaac aaatgttttgg gcc
ggacctggga tggggccacag tgcccctgctc tgt
ccagaacaaaa tgcgtcccat actggcccga ggt
ctctgtgacc aactgcgggg agcatgacac aac
ctccccgctg gacaatgtga gtggcccccac cgc
ggacttgttct tcctctcttggt tcgggtaggg tga
gggggcaactga cccatatgtcc tcggccttagg gag
agtacctgag ctggcccgcac catgggggtcc cca
tggaccagat caaccagcgg caggaaagtc tgc
gcagggtgagg atgataaatcc tgatggtagt agt
tgccatgagc tgttataaagc aatataaacg tta
cccccggtt ctccctgggtc cccctcatggc tcc
ccagcccccac tttggcccctc tgccctgtggg tat
catctcgccc aaccctgcca aatacagagg agg
ccaagctagt caggggcaagg ccggggcaggc acc
cgctttctct ctaggtccca ttctgtttggt ttc
tgctccccat tcctcctctt tttccatcgg tag
ctgcccctctc tcccagcttc cccaggcagt gcc
gatgggtgat gcttcttttg ggctgcacat aac
tgatcaggag acctctggta aggtgcagag gtg
acagggtgagc ccactgagct ggccctggccct ggg

```

10

20

30

40

ccctcgcctta ccagctgigt ggctctggac aaattactta acttttctaa ccttcagctt 14940

c c t c a t c t g t	a a a a t c a g g a	t c t c a g g g t t	g t c	
g t g g c t g g a a	t t c c g t c a g c	c c t c a a a a a c	t g g	
t c a g g c a g a g	a a t a g g g g a a	t g g g a a c c t g	c c t	
t g g a c c c c a g	g c c t g c g a c g	g c c t c t g g c t	t c c	
t g g g a c a g g g	c a a g t c g g c t	g a a t c t a g a g	g t g	
c t c t g t c c t g	t g c t c t c t c a	g g g a c a g g c c	c a t	10
g c c a c a c a c a	c a t t c a c a c a	c t t c t t g a a a	g c c	
a a g g a a g t g g	g t g t g g g g g g	t t a t t t t t g a	c a a	
t c a g g g c a t c	a g c t t g c t g g	g c t c a g c t g a	g g g	
t t g c c c a g g g	c t g g g a a a g g	a g a g a a a c t t	c c t	
c c c t g t g c c c	c c g c a c c c t g	c t g t c t c a g g	g c t	
g g a a a a g g g a	a g t g a a g c c a	t g c t g a g a g a	c g c	
g a g g g c t c a g	g g t a c c t g g g	a g c c g g c a g g	a c a	20
t c c g g g g t g g	g g g c a g c c a c	t c a c t a g g a g	t g a	
a a g g a t g g t g	g c a g c t g g g g	a g c c a g c g t c	a g c	
c a t g c a g a g c	t g g g c a a a c c	t c c a t c a t c a	c t t	
c c a t c a c t g g	a g g c t c a g g c	t g c t c c t g t g	g t g	
c c c c c c t t c c	c g g g g a g g g c	t t g a c t g g c c	t c t	
c g g c a t c g g c	c g c a c a g g g a	c c a t c a t t g t	c a t	
c a a g g g t g a g	g g g c a c c t g g	g g g t t t g g g g	g t g	30
c t a t g c c t g g	a c c t g a g g t t	t g a c t g c c c c	c c a	
c c a g a a g a c c	a t c c a g a t g g	t g c g g g c g c a	g c g	
g t a c a a g t t c	a t c t a c g t g g	c c a t c g c c c a	g t t	
g g t c c t g c a g	g t g c g t g c a g	a g c a g g g c c t	g g g	
g t g c c a c c t g	g c c c t g c t g g	g a c c a c c a c c	t t c	
a a g g g c c a g g	a g t c g g a g t a	c g g g a a c a t c	a c c	
g c c a a g g c c t	c c c g c a c c t c	g t c c a a g t g a	g t g	40
c c c c t t t g t c	c t g c c c a g c c	c g a t c c t c a c	t t t	

```

gggacciggc ticaagtica ggctiggttc tcaccccttc tgttcataag catttcciga 16680
gtgcccacac gtgtggggcct ctgctaggta cca
ctctgtcctc taggagcttg gagtctagtg cag
ggggtggcca gagggggactg ccagtgccgg gtc
aactgcctgt acttgcccc ctcgacccgg ctg
cctgcacact aagaacaaga gggaggagaa agt
gaagagcaag ggttccctca agagggaagtg agc
agctctttctg cctggggtgtc ctccctgccc tgc
ctggggtggat ggggtggccg cagcctcatt ctg
gttccacctc caggttccag ctacctctc act
agccctgacc ctgtggaagc atttcgcgat gga
ccccattctt ttgtaattta aatggctgca tcc
agcccagcca ggccccaggc agggccaacc ctt
caactgtgtgt cgccctctgag cccttttgctt gcc
caggatgggt aactgtgtgt gcctccgtgc gtg
agacggacgt gggctcgggac tccgcctcgc acg
ccagtcctct tcttttaaaat ggaggggcgat cat
atgacggctg acgataagac gggcacagtg act
actaaaagac tacacacggt agttcagtc t agg
gcggaaactg agggacagaa aaactaagta act
atggaacagt gaggcctggga ttcgaacca ggc
accctggagt tgcagctggg gccaccctca ggg
gagttccaga tctgaactaa gaagagtagt taa
cccggctgcg tccccctctgg cgggaacagg gac
cagctcctcc cctcatccag gccgctgctg ccc
ctggctgacg tgaagagtg c tttgtttttt gtc
gggggtttctt cttttatttga aacactgggtg tcc
cctcaggaag tgctggcgcc cactcctgga aag
agaggctggg cgtgcattac tcagcaaatic ctt

```

10

20

30

40

acagtcctccc gacctcctgg aacttaggag gcctggcagg gaga

18404

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; genomic DNA

&lt;400&gt; 2

tctccctgac	cagcctccta	agttccagga	ggt
gggggctctg	taaggatttg	ctgagtaatg	cac
gctgtctcag	ccttttccagg	agtgggcgcc	agc
tttactcccc	aggacaccag	tgttttcaaat	aaa
aaggaagagg	ggacaaaaaaaa	caaagcactc	ttc
caagaggata	agggcagcag	cggcctggat	gag
ctgaggagcc	tgctccctggt	cccgccagag	ggg
gcttccggct	gttaactact	cttcttagtt	cag
gatacagggcc	ccccctgaggg	tggccccagc	tgc
gggggtcagac	agcctggggt	cgaatcccag	cct
gcaagtgacc	aagttactta	gttttttctgt	ccc
tgacagaagt	gcctagactg	aactaacgtg	tgt
agcgtgtgat	gagtcactgt	gcccgtctta	tcg
accaccctgt	tatgatcgcc	ctccatttta	aag
tcaccctccc	acgtgcgagg	cggagtcccg	acc
ttcacgcgag	gcacgcacgg	aggcacacac	agt
cccactcact	gggcaagcaa	agggcctcaga	ggc

20

30

40

tacaagagga gaagggctgg cccigccctgg ggccctggctg ggctatatac agggicaggg 1080

agaggtgggg	gggatgcagc	catttaaatt	aca	
ttgtgagtct	gtccatcgcg	aaatgcttcc	aca	
gggagtgagg	gagtgagagg	gtagctggaa	cct	
gctgggaagc	acagaatgag	gctgcggcca	ccc	
aaggacacag	ggcaggggcag	ggaggacacc	cag	
aggacagcac	cgctcacttc	ctcttgaggg	aac	10
gctgcttctt	cactttctcc	tccctcttgt	tct	
ccttggtgtct	gcagccgggt	gcagggggggc	aag	
cagcacaggg	ggacccggca	ctggcagtc	cct	
agccacggtc	cctgcactag	actccaagct	cct	
gagtgcgctg	ctgggtacct	gcagaggccc	aca	
aacagaaggg	gtgagaacca	agcctgaact	tga	
gtcctctcca	gaaagtgagg	atcgggctgg	gca	20
gcagtcaggg	ccactcactt	ggacgagggtg	cgg	
gctgggggat	aggatgatgtt	cccgtactcc	gac	
agggacagtg	ggaagggtggt	ggtcccagca	ggg	
cccccccccc	ccccaggccc	tgctctgcac	gca	
tggtttcaat	gaactgggcg	atggccacgt	aga	
ccatgcccga	gcgctgcgcc	cgcaccatct	gga	
ccaggccctgg	gtgggggggca	gtcaaacctc	agg	30
tgctcacccc	ccaccccccaa	acccccagggt	gcc	
tgagcatgtc	gatgacaatg	atgggtgcctg	tgc	
gggggtgccat	cagaggccag	tcaagccctc	ccc	
ccagccccag	gcaccacagg	agcagccctga	gcc	
ggtcaccggg	caagtgatga	tggagggtttg	ccc	
ggctctgcgg	tgctgacgct	ggctccccag	ctg	
gcgccgactc	ctcactccta	gtgagtggt	gcc	40
aatcccacca	ctgtcctgcc	ggctcccagg	tac	

ggagttaagg agcgicicic agcatggctt cacticcctt ticcitcaaa cccigacgic 2820

agggaaggga	tagccctgag	acagcaggggt	gcg
agcagtgag	taggaagttt	ctctcctttc	cca
ccccaggccc	accctcagct	gagcccagca	agc
tcaaacccag	attgtcaaaa	ataaccccc	aca
aaaggccatg	gggcctttcaa	gaagtgtgtg	aat
agctctcggg	gatgggcctg	tccctgagag	agc
cccatcgggg	gcacctctag	attcagccga	ctt
gggggaagg	aggaagccag	aggccgtcgc	agg
ggaccggggc	aaggcagggtt	cccatctccc	tat
agtaacagcg	cccagttttt	gagggcctgac	gga
tgagttctca	cgacaaccct	gagatcctga	ttt
aagttaagta	atttgtccaa	gaccacacag	ctg
cctctcatcc	accagggcca	ggccagctca	gtg
cttgcagccc	ccacctctgc	accttaccag	agg
tagacagagg	agttatgtgc	agccccaag	aag
ggccaggatg	gggcactgcc	tgggggaagct	ggg
aagccctgcg	gctaccgatg	gaaaaagagg	agg
tcctggggaga	agaaaccaac	agaatgggac	ctc
ggcctactgt	gggtgcctgc	ccggcccttgc	cct
ggtcccgggc	tcctcctctg	tatttggcag	ggt
ctctgaggaa	gatacccaca	ggcagagggc	caa
cccagggttc	tggagccatg	aggggaccca	gga
aatgtgcgag	ctaacgttta	tattgcttat	aac
tctcagctgt	cactactacc	atcaggatta	tca
ccctgcgtga	ggcagacttt	cctgccgctg	gtt
cccaggctca	ctgggggaccc	catggtcggg	cca
ccgaatcagg	tctccctaag	ccgaggacat	agg
cctcatccat	ctcaccctac	ccgaccagag	agg

10

20

30

40



aatggggcag ggcgiggggg ccaticacat tgcacagcgg ggagaccigt aaggtaaggga 4560

g t t t g t a t t c	g g t t g t g t c a	t g c t c c c c g c	a g t
g c t g c a t g c c	c a c c t c g g g c	c a g t a t g g g a	c g c
g g g g a t g a g g	c a c a g a g c a g	g g c a c t g t g g	c c c
t g c c t g g c a c	c g g c c c a a a c	a t t t g t t g g a	t g g
a c c t g g g c t c	t c g t c t c a g a	t c a a c c a c c a	a c a
c c g g t a c a t c	c g t t t g t c a t	t c a a c a a a c g	t t g
t g c a a a c c a c	a c a g c t t c a c	a g a c a c a a a t	a a c
g a g c t c a c a g	a g a c a g g t g a	c c g g g g g a g a	c a c
c g t a a t t c t c	c c t c t a g g t c	c t g g a g g a a a	c a a
t c c g g c t g t g	t c t t c a a a a a	c g a g g c a t c t	g c c
t t c c t a g c a g	a a a a t g a g c t	t g t g c a a a g a	a a g
c t g g g g g c g g	t g a g c c t t c a	a g a g a a g c g t	g c g
a t g c c a g g c c	t t a g a g t g c g	a c t t t a t c c c	a a a
c a g a a a g g a a	g g a a c t t g a c	c c a g t t t g t g	t c a
a g a g g g t g c t	g t g t a g g g g g	a g c c t g c a g g	g t a
g g c a g g g a g g	a c a g g a g g g g	c c t g g a t g c a	g a c
g a c a g c c t g g	a a c c t g g g t c	t g g a g c t c a g	a a g
g g g t c a c g t t	g t g t a g t c g a	g a c t t t g t c a	c t a
c c c t c a c c c c	t g a g a t c c c t	t t c t g c c c t g	g c a
g a c c a c a a g c	a c g g g g g c g g	a t g c g g g g a a	g g g
c t c t c g g g t g	g t c a t g a c g a	t g a c a c g g c t	g t t
a t t g a c c g t g	g c c t c c a g a c	a a c c c t g g c t	g g c
g c c t a g c a g c	t g g t t c t g g a	c g c a a g c g t g	g a g
t g g c c c a g c a	c a g g c c c t g a	a c c a c t g c c a	c c c
t t t g c c c a g c	t g t c t c t g g a	t c t a g g g t c c	c c c
g c c t c t c c t c	c c a c g t g g c c	c a c a c t g c t g	a c c
g a c c c g g g g a	t g t t a c t g t c	c c g t c c c t g c	a g g
g g g c g g a g a g	g a g g c g a g a t	g g t c t g g g t t	a g c

10

20

30

40

```

ccctcctgagc taacaggcca ttctggcttc agaagccaatg aggcctgcgg gggactiggg 6300
gcagcaggggg tgggggga tca tctgtatgga ggg
agcaggggggc aacctgacctg ctgggtgggtgg gga
ttggagaagg gggaggctct gtgggggggtg tgg
tgagagacctg tgagatgagg ggaggcagct ggg
gcagccctggg tgctcacagg ggagaaatgtt ctt
ccgctgacct tccagacgct ggtgcaagt ctt
tgtgggtggg gaaatgagca tcagctccca aag
gggtgggtca ggagcagagg tgggcaaggga ggg
gctgccacca cctcagctgc cccagccctg ccg
ccagaaggcca gcccttggctg tatcctcgga ctc
gttctcaatg tcagccgcat tcaccctcgt ggc
agaagtcagc aactcagaga tcccagaagc tca
gggagggcagc tggggcccacc cctgacctgc cgc
tcaatccccg tcttcttgaa atgctccacc agg
ccacccactg tgtagcgtcc accctgggggg gag
gtctccctcc ctgggtcccc agccttgaat tca
acactgttgtt cacagacagg agcctcagca gag
tcgcacatga ccttgatgtg ggtgacctg agc
tcactgagca cagaaagcac gaagtctcca ggc
gtccaggggct cgcccttggc ctgcagcagc gtc
tggtaccacc tagagaaggc agcgtcaggga aag
ctgagcagag acattcacag agaggggccg gaa
tgcgctacat gcttccaaat ccaccacctc att
taggtatgat attaccccca ttttatagat gag
ggcctaggggc ccttgactga ctctaggggca agc
gtgcagtggt gcggttacag ctctctgcag cct
cctccagagt tctaaccggg cttcgaacc aga
gcaatat tca aaatat tgg aggagagaag cta

```

10

20

30

40

tgigccccag cagagaccag aggcaaagag aaacgcagac cgaggccaca ccacagggag 8040

t g g t g g g a g a	t g g a c a c a c a	g a c t c a a g t c	a c a	
a g g g a g g c g g	g g a a g a c a a c	c c c a c t g g g g	a a a	
c t g g a t g a t g	t c a c t g a a g g	g g a g c c c a g g	g t t	
c a g a a a g c a g	a a c t a a g c c c	t t t c c c c g a a	g c a	
c c c c a c a a a g	c c c a g c c c c a	c a g g a a a c c a	c g t	
g g g a g a g a g t	g a g a a g t g a g	g t t g t g a g g t	t t c	10
g c a a a t t t t t c	c a a c c g c a g g	g a t g g g g g g a	a g g	
t c t c a c c c c t	g c c c g g a g g t	g a c t c c a g c c	g a g	
g g g c t a c t t c	a g c c c a c c g c	c t g g g g a c a g	g c t	
g a g c c c c t t c	c c t c a g g c c c	c a g g a t g a g g	a a g	
a g g a a g c g c a	g a g c c a c c g a	g g g a c a g a t g	c a a	
c a a g g c a g a g	g a c a c a g c a g	a a c c t g g g a g	a a a	
g g g t g a c a c t	g g c t c c t g g g	a c g g g t c a c c	c a a	20
c t t a a c c t c c	c g c c c c g g c a	c t g c c c t c c c	t t c	
a c c c a g g c c t	c a g c c t c c t c	t g c a g g g g c c	t c c	
c a g g c a c t g g	t c a g c c c g t c	c t c c t c t c c t	g g c	
a g c t t t a g a g	g g t c t c g g t g	c c a a a a g c c c	c c t	
c a g g g g g c a g	a c a c g g a g c c	a g c c a t g t g a	g g c	
a g g c c g a t c c	a g g a a a g g a g	g c c t c c c a g g	t g g	
c a g c t c t a a g	t t t c a a t c a g	t g c c t t g a c c	a a a	30
t c t c a g a g a g	g c t g c a a g c t	g g c a g g a g c a	a g g	
t g a a t g c a g g	g a t c c a c g g c	a a g g g c a a g t	c g g	
c c c t a g c g t t	a t t c c g c t g c	c c t t t a c t c t	a a g	
g a a a g g a g c c	a t g g t g t c a t	g a g g a g c a t t	c a g	
g g g a g a c c a c	a g g a g g a g t c	g g g g a g g c c a	c a g	
t g c c c g g g a c	a g c g t g a g a c	a c t t t a c a c a	g g t	
t c t c t g t t t g	g g c c g g a g a c	c t a t t t g a c c	c c a	40
c t g g g a c a a g	g c a t c a a g t g	t c t t g g c a a g	c a t	

ctcctcactg tcciaacaatg tgciggggig aggggcagac ggaggaaggc aggcicgait 9780

ccagagggaag	aagagcctttc	taacaacaga	gct
agtggcctcc	ctgtctccag	tgggacctgg	gtt
cgaggcagct	ttctgtggct	tcctcgggggt	tag
agacaccagg	tcccaggaca	gcagggagga	ggg
aggggagggg	atggagggtta	ggcagcgccg	gct
cagggtggga	gccggctcat	ccctgcttgg	gaa
cactagtggg	atcggagcag	ttcagcgggt	act
cctgcaggac	accctgctgc	tgagtgtagt	act
tctccccctcc	atacagggtca	tagaaatccc	ctg
gatccccccac	cctgcaggggc	accaggcggt	gag
agggcaggga	tcggctgagg	tcctgggtgg	ggg
agggatgggg	agtgtggggg	ttggggggcaa	ggg
gggaaccagg	aatgagtgggt	tcaggggcctg	gat
gggttgcggg	gggcccacct	acctgacgga	gag
gggcccagacc	aggaagctac	cgtggacacc	tcg
cccactgagg	tctcgggtgaa	accacctggg	cgg
cgtggggcacc	aggcaccctt	gcctcctgtc	tac
tcctggggggc	ttccggagag	gaagggggcg	cag
caggcagaga	gctcagggac	taagcctcag	atg
accccccggtg	gtcccagttc	tggggctgcc	act
ggggacaggga	agaggcgcg	ccgacccctt	ggg
agcacagcaa	gggaagagaa	gcagagcagg	gtg
tcccacacgt	ctgcaatcaa	aggctcagga	gca
gcagtaaggga	cacatgtgtg	ccttgcacac	tcc
aaccacagacg	gtcccacggc	atctctccct	cct
ctggcccacg	ctaataacaa	tgatggcggt	gac
tgccggggcgc	tgtgctataa	tggcgttcac	atg
ccctatgaaa	cagggggctat	ctttatcatt	tta

10

20

30

40

```

titaaggcat igcctgagtc catcagtgag tcagctgcag igccaggatt caaaccaga 11520
cagtc cgggtt ccaaagccag tgctttgaac tcc
aacagagatt aagagcctcc ttgtccaaag ggg
taagaccttg ccaatgcttg caagagagaa ggg
ttgtccatgc cactgtggca gagggatgga caa
gggtccctttc taattcttgt ccctaggcct ctg
cctatctcct gggggctggg ggacaagggtc ctc
tgatcttaga ggccctaaac actaagggtat atg
aaacatcaac accgccaaac caaaacgagg aaa
acacatatatg gtggcttccc ctagggagggg aaa
gagacacttg gttctctaca taccttttttg aat
ataaaaaataa atatgctaac tgggaacaat ttc
ctcttttgtct ctatctggat gctgttttgca tgg
cgcagtggtc cacgcctgta atcccagcac ttt
gtcaggagat cgagaccatc ctggccaaca tgg
aaaaaaaaatag ctggggcatgg tgggtgggcgc ctg
caggagaatc acttgaaccc aggaaggccga ggt
actccagcct ggcaacacag taagactcta ttt
ttgtgtgctt aatatattatg aacattatgc atg
ttttaagccc aacaagtcta attttcccat gat
aaacatcaat gtttttccccc aaaaaaggct ttt
at ttgttttct ggtttttcttc tctcactggt gcc
gcatgggtcca gcttttgacta ccccttcagc ttg
gcgggaacccc cacgcccacac gccaaaggagc aag
gcggggacacc cgctgggcgct ctcgctcatc tcg
ggcactgagc aagtgttcaa caaacaagct cgt
agtacagctt cctgggtccta cacacacagc ctg
cacagtcaca gcacacacac ctcatcatcc atg
gcacatcccc acgcatggaa cataaatctg acc

```

10

20

30

40

```

gcaccaaacg cccacigcac cctggcccca agacactcct tccagggcct aaacccacit 13260
ggtgggaagg aattaactcg gcacccagaa gaa
tggaagaggc aggaattcct ctgaagggtg tca
gtacagcttc tgctatcctt tggcaggaaa ata
gtgtgggggtt tgcagatcac tttcacatac acg
tgatgtagga atcatttttcc ccatTTTTctt atg
aattacaaga gtaaattgcct gataattcag aag
gataaaaagta gagatcaagg ccaggcgcag tgg
gggggtgagg ctgggtggatt acttgacacc aag
aaacccctgtc tctacaaaaa atacaaaatt tag
cccagggtact tgggagactg agatgggagg atc
agtgagccat ggttgtgcca ctgtaatccg gcc
aaaaataaaa atacagctgg gcgcagtgac tta
ccgagggtggg aggatcactt gaggtcaggga gtt
ccccatctct actagcctgt aatcccagct tct
gatcatgcca ccgcactcca gcctggggcaa cag
aattaaaaaac catacagatc aagatcaatg gtg
gcaaacaggc caaaataatc tgtagaaagt tct
gcctgacaaa tgagcttaac aatatTTTccc aaa
agggttttcag tgctgccagc ttttacatta tac
gtaggtgtta ttcacccaat tttagaaaca gaa
gccaagggtc acaagctagt gagtaggaag gtg
gcctgggtgcc ctttccccca acaaccatac tgc
tggggcactgc cacagcccat gatggaagggt gga
tgggtcaggg caaagagggtg gcacgcacag agt
aagccatgtg gctggagcaa agttgttctg aga
tcaaggccag gctgagaaac caaggatgaa atc
cctgggcaggaa aaatgaccac agacgggatc agg
cggtgggggcc gacagtgaca agatgtgcac tgg

```

10

20

30

40

caagaatcag cagggctagg gagccacca cccacaaact cgccagtact ctgtaagcag 15000

g t t g t c a c t t t	t t t c t t t t t c t	t t t t t t t t t t t	t t t
c a g g c t g g a g	t g c a g t g a c g	c a a t c t c g g c	t c a
c a a t t c t c c t	g c c t c a g c c t	c c c t a g t a g c	t g g
g c c t a a t t t t	t t t t t t g t a t	c t t t a g t t g a	g a c
t c t t g a a c t c	c t g a c c t c g t	g a t c c a c c t g	c c t
g c t t g a g c c a	c c a t g c c c a g	c c g g t t g t c a	c t t
c t t t t t c t t t	t t c t t t c c t t	t c t t c t t t c g	a c t
t t c t t t t c t t	t c t t t c c t t c	c t t c c t t t t c	t t t
c t t c t t t c t c	t t t t t c t t t c	t t c c t t c c c t	t c c
t t t t t t t g a c	a c a g a a t c t t	g c t t t a t c a c	c c a
t c a c t g c a g c	g t c g a c c t c c	t t g g c t c a g g	t g a
t g a g a c c a c a	g g t g c a t g c c	a c t a c a t c c a	g c t
t c g t a g t a g a	g a t g a g g t c t	c t c c c t a t g t	t g c
a a g t g a t c c t	c c c a c c t c a g	c c t c c c a a a c	t g c
t a c c c a g t a t	t t t t t t t t t a a	t a g a g a t g g g	g t c
a c t c c t g a g c	t c a a g c a a t c	t t c c c c c t t c	g g c
g c g c c a c c t c	a t c t c g t c a g	g t t t t c a c t t	t c a
t g c t g t g g c c	c t g c c t c c g c	t c c a c t a g g g	t c c
t g t t t g t t c c	c a c a t t a g g g	c t t t g t g c t c	a c c
c t t g a t c a c t	a c g t c a c a t g	g c c a g c t c c t	c t t
g t c a c c t c c t	c g g g a a g g c c	t c c c t g a t c c	c t c
g t c a c t t g c t	a g c a t a t g a a	g c t g g t t c a t	t t t
g t c t c a c t c t	g t c g c c c a g g	c t g g t g t g c a	g t g
a c c t c c c a g g	c t c a a g c a a g	c c t c t c a c c t	t a g
t g t g c c a c c a	c a c c c a g c t a	a t t t c t t a t t	t t t
c c a g g c t g g t	c t c a a a c t c c	t g g g c t c a a g	c a a
t g g g a t c a c a	g g t g t g a a c c	a c t a c a c c c g	g c c
t c t g a g a a t c	t g c a a t g a t c	c a a t t t a t t g	g g t

10

20

30

40

ggaatgtaag ciccgtgaga gcagagacca tgcicgtctt gttcactcca gtattaccag 16740

c a t c t t a a a c	a g c a c c t g g t	g c a t a a t a g a	t g c
g c a g g g g a a a	g g g a a g t g a a	a g g a a a c a a a	g a a
g t g c g g a g a a	g t t g g c t g g a	c g t g g g a g g g	c c t
t g a g g t g t t g	t g a g c t a c c c	a g g g g g a c a g	g t c
a g a g g c t g g a	a g t a g a a a t g	c a a t g g a g a g	a a c
t t a a a g a g g g	g g c a g a g g a g	c a t g a g t g a g	c c g
a a g t t c a t a g	g g a c c g g a a a	c a g g c g c a g g	g c a
c g t c g g a g t g	a g c a t c a a c a	a a g c c c t c c c	t c c
c c g a t g g t g c	c c g g g a c t t a	c c c a c g g g a c	a g c
g g c g g a g g g c	c g c a g g g g g c	g g g g c t g a g c	c a g
c c a g g t g a g g	a a g a a c c g c t	c a g t a a t c a g	c c a
c a a t g g c a c t	g c a g g g a c a a	a c c c t g g a c t	a a t
g g g g c t g g c c	c g a g a c c g c c	c a c a g c g g c c	a g c
a g c a g g c c c g	c c t g c t g g t c	c a g g g c c g c c	t t c
c t c c a c c t g g	a g c t c a a g c t	g a c a g a g c g g	c g g
a g t a a c c c t g	g c t g a g g a a g	a g c a a c c a a t	g g g
a g g g c c t a a g	g a a a a t c c c t	a a c a g c c c a g	t t c
g g c c c a c c c a	c c c a g g g c g c	t g a g g g a c c c	a c t
g g g g a g g a g c	c t c a g g t a g g	g t t a g g c c c t	g g g
g g g a g g a g c t	g t t c a g g g g g	a t g g g g c c t g	g a a
t g g g g g t t g t	c a g g t c c g c a	a g a g a c t g a c	a c c
t t g t c t g g a a	c a t c a a g g c c	t t t c c t c c c c	t g g
a g g a g g c g g c	c a c g c t g c c a	c c a g c a g c a g	g c c
g a a a c a g c g c	c t t c a g c t t g	c c t g a c a g g c	t g g
a c t t g a c c a a	g c g a g c a a a c	t t a a g g a c a c	c t g
t c c t a a g g a c	c a g c g t g c c t	a a g a c a c c t g	g a g
c c c c c a c t g g	c t g g g c a g c t	g t t t g c c a a a	c a g
g t t t g g a t g a	t g a c a t t t g g	t c t a c a c t g g	g c a

10

20

30

40



&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1794

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; complementary DNA

10

&lt;400&gt; 3

```

atgctgtccc gtgggtggtt tcaccgagac ctc
aagggccgag gtgtccacgg tagcttcctg gct
ttctcgcctct ccgtcagggt ggggggatacag gtg
gattttctatg acctgtatgg agggggagaag ttt
tacactcagc agcagggtgt cctgcaggac cgc
ccgctgaact gctccgatcc cactagttag agg
caggcagaga cgctgctgca ggccaaggggc gag
ctcagccagc ctggagactt cgtgcttttct gtg
ggctccccgc tcagggtcac ccacatcaag gtc
ggtgggtttgg agaccttcga cagcctcacg gac
attgaggagg cctcaggcgc ctttgtctac ctg
aatgcggctg acattgagaa ccgagtgttg gaa
acagccaagg ctggcttctg ggaggagttt gag
ttgcaccagc gtctggaagg gcagcggcca gag
attctccccct ttgaccacag ccgagtgatc ctg
tccgactaca tcaatgccaa ctacatcaag aac
aagacctaca tcgccagcca gggctgtctg gag
gcgtggcagg agaacagccg tgtcatcgtc atg
aacaatgcg tccatactg gcccagggtg ggcatgcagc gtgcttatgg gccctactct 1140
gtgaccaact gcgggggagca tgacacaacc gaa

```

20

30

40

```

ccgctggaca atggagacct gattcgggag atc
gaccatggggg tccccagtgag gcctggggggt gtc
cggcagggaag gtctgcctca cgcaggggccc atc
cgcacaggga ccatcattgt catcgacatg ctc
gactgtgaca ttgacatcca gaagaccatc cag
gtgcagacgg aggcgcagta caagttcata tac
actaagaaga agctggagggt cctgcagtcg cag
atcacctatc ccccagccat gaagaatgcc cat
cacaaggagg atgtgtatga gaacctgcac act
aagcagcgggt cagcagacaa ggagaagagc aag

```

10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 595

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 4

```

Met Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser
  1                               5

```

```

Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser
                20                25

```

30

```

Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser
      35                40

```

Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly

50

55

Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu

65

70

Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp

85

10

Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr

100

105

His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr

115

120

20

Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser

130

135

Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro

145

150

30

Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met

165

Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser

180

185

Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala

195

200

40

Arg Gln Pro Tyr Tyr Ala Thr Arg Val Asn Ala Ala Asp Ile Glu Asn  
 210 215

Arg Val Leu Glu Leu Asn Lys Lys Gln  
 225 230

Ala Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser  
 245

10

Asn Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln  
 260 265

Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe  
 275 280

20

Gln Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly  
 290 295

Tyr Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro  
 305 310

Ile Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala  
 325

30

Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val  
 340 345

Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val  
 355 360 365

40

Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser
	370					375		

Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr
385					390			

Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp
				405				

10

Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro
			420					425

Leu	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu
		435					440	

20

Ile	Ile	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Ile
	450					455		

Val	Ile	Asp	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile
465					470			

30

Asp	Ile	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln
				485				

Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr
			500					505

Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser  
515 520

Gln Lys Gly Gln Glu Ser Glu Tyr Gly  
530 535

Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser  
545 550

10

Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr  
565

Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys  
580 585

20

Lys Arg Lys  
595

<210> 5

<211> 18404

30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> bisulfited genomic DNA

<400> 5

40

ttatttagtt gtgttttagtg tagattaat gtt

ttgtatgcgt ttgttttggg aaatagttgt ttagttagt ggggagtagt ttagtttag 120

a t t a t t a t t t	t t t t t a g g t g	t t t t a g g t a c	g t t
a t t t t t t t t t	g t a g g t g t t t	t t a a g t t t g t	t c g
t t t t g a g a t c	g t t a g t t t g t	t a g g t a a g t t	g a a
g t t a t t t t a t	g g g t t t g t t g	t t g g t g g t a g	c g t
t t g t g t t a t t	g t t a g g g g g a g	g a a a g g t t t t	g a t
g a t t t a g t t t	t g g t g t t a g t	t t t t t g c g g a	t t t
t t t t t t t g t t	t t t t t a g g t t	t t a t t t t t t t	g a a
t t t a a t t t t g	t t t t a g g g t t	t a a t t t t a t t	t g a
t g a g a g g t t g	g a g t g g g t t t	t t t a g c g t t t	t g g
t t t t t t t t g a	g g a a t t g g g t	t g t t a g g g a t	t t t
g a g a g g t t t t	t t t t a t t g g t	t g t t t t t t t t	t a g
t a t t t a a t a t	t t c g t c g t t t	t g t t a g t t t g	a g t
t t t t t t c g g g	g g a a g g c g g t	t t t g g a t t a g	t a g
g t t g t a g g g a	a g t t g g t c g t	t g t g g g c g g t	t t c
t t t t g g a g a t	t a t t a g t t t a	g g g t t t g t t t	t t g
c g a g g a g g a a	g t g g t t g a t t	a t t g a g c g g t	t t t
t a g t t g t g t c	g t t g g t t t a g	t t t c g t t t t t	t g c
t a t a g a g a g a	t g t t g t t t c g	t g g g t a a g t t	t c g
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g t t t t g t t g a	t g t
c g a t t t g t c g	t t g t t t t g c g	t t t g t t t t c g	g t t
g t g a g g a t t t	t c g g t t t a t t	t a t g t t t t t t	t g t
a g t g t g t a t t	t g t t t t t t t t	a t t g t a t t t t	t a t
t t t t t g t t t a	g g a t t t g t t t	t t t t g g g t a g	t t t
g t t a t t c g c g	a a g g t t t t t t	t a c g t t t a g t	t a a
t t g g t t t t a t	t t t t t t t g t t	t t t t t t t a t t	t t t
g t a c g t g t t g	a g t a t t t a t t	a t g t a t t a g g	t g t
g a a t a a g a t a	g a t a t g g t t t	t t g t t t t t a c	g g a
t c g a a t a a a t	a a t t t a a t a a	a t t g g a t t a t	t g t

10

20

30

40

tagatagittt tggicgggtg tagtggittt tatttgtgat tttagtattg tgggaggttg 1860

aggcgagagg	attgttttgag	tttagggagtt	tga
ttgttttttat	aaaaaaaaataag	aaatttagttg	ggt
ttatggagag	gttaagggtga	gaggttttgtt	tga
gatgattgta	ttattgtata	ttagttttggg	cga
aaaaaaaaaaaa	gaaaaatgaat	tagtttttata	tgt
attatttagtt	ggaggggatta	gggagggtttt	ttc
ggatgaggag	gaagaggaggt	tggttatatgtg	acg
gtagaggaga	tggtgagtata	aaagtttttaa	tgt
ttcgtggtag	aggatttttag	tggagcggag	gta
agttaggatg	ttgaaagtga	aaattttgacg	aga
tatttttggga	ggtcgaaggg	ggaagatttgt	ttg
taatatagag	agatttttatt	tttatttaaaa	aaa
tggtagttttt	agtagttttgg	gaggtttgagg	tgg
gattatttttg	ggtaatatag	ggagagatttt	tat
tatttaataaaa	tagttggatg	tagtggtatg	tat
aggtaggagg	attattttgag	ttaaggagggt	cga
gtatttttagt	ttgggttgata	aagtaagattt	ttg
gaaggaaaga	aggaaggga	ggaagaaaga	aaa
cgagaaagaa	gaaagaaaag	gaagggaagg	aag
aagtgatatt	tagtcgaaag	aagaaaggga	aga
gaaaaaagaa	aaagtgataa	tcggttgggt	atg
ttgggaggtc	gaggtaggtg	gattacgagg	tta
ggtgaaatttt	tgtttttaatt	aaagatatata	aaa
atttgtgagt	tttagtttatt	agggaggttg	agg
ggaggttgta	gtgagtcgag	attgcgttat	tgt
ttttattttta	aaaaaaaaaaaa	aaaaagaaaa	gaa
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gttttttttagt	ttt
ttgttttttgt	tttagtgtat	attttgttat	tgt

10

20

30

40



gttttttgggt ttttgatttc gtttgigggtt atttttttgt taggtagitt ggtaggitt 3600

t t t t t g g t g t	a g a t t t t a t t	t t t g g t t t t t	t a g
g g g t t t t t a t	t t t t t a g a a t	a a t t t t g t t t	t a g
t g t t t a t g t g	g a t t t t g t g c	g t g t t a t t t t	t t t
g t a t t t t t t t	t t t t a t t t t t	t a t t a t g g g t	t g t
c g t t g t t t g t	t g t a g t a t g g	t t g t t g g g g g	a a a
c g t g t t t t a t	t t a t t t t t t t	a t t t a t t a g t	t t g
t g a g t t t t a g	t t t t t g t t t t	t a a a a t t g g g	t g a
g a g g a t t a a t	a g t a t a a t g t	a a a a g t t g g t	a g t
t t a t a t t a g t	a t t t g g g a a a	t a t t g t t a a g	t t t
a g a g t a g t t t	t a g a a t t t t t	t a t a g a t t a t	t t t
t t t t t t t g t a	t t a t t a t t g a	t t t t g a t t t g	t a t
g g a g t t t t a t	t t t g t t g t t t	a g g t t g g a g t	g c g
t t t a t t t t t t	g a g a a g t t g g	g a t t a t a g g t	t a g
a g t t g g t t t c	g a a t t t t t g a	t t t t a a g t g a	t t t
g a t t a t a g g t	g t a a g t t a t t	g c g t t t a g t t	g t a
t t t g t t a t t t	a g g t c g g a t t	a t a g t g g t a t	a a t
t a g g t t t a a g	c g a t t t t t t t	a t t t t a g t t t	t t t
a t t a t a t t t g	g t t a a a t t t t	g t a t t t t t t t g	t a g
t t g t t t t t a a	a t t t g g t g t t	a a g t a a t t t a	t t a
a t a g g c g t g a	g t t a t t g c g t	t t g g t t t t g a	t t t
a a t a t t t t t t	t t t t t t g a a t	t a t t a g g t a t	t t a
t t g t t t t t g t	t t a t a a g a a a	a t g g g g a a a a	t g a
t t a a a t g a g a	t c g t g t a t g t	g a a a g t g a t t	t g t
a g g t a g t t t t	t t a t t t t t t t	g t t a a a g g a t	a g t
g t t t t t t g g t	t t g a t a t t t t	t t a g a g g a a t	t t t
g t t t a g t t a g	t t t t t t t t g g	g t g t c g a g t t	a a t
t g g a a g g a g t	g t t t t g g g g t	t a g g g t g t a g	t g g
a t t t c g t g t g	t g g t t a g a t t	t a t g t t t t a t	g c g

10

20

30

40

gtgtaggtag atatggatga tgagggtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt ttttgtttg 5340

cgtatgataa	gtagggttgtg	tgtgtaggat	tag
gttataggatt	gacgagttttg	tttggttgaa	att
tttgaatat	tcgagatgag	cgagagcggt	agc
tatgtgtttt	ttttgttttt	tggcggttggg	cgt
gggggtgggtgt	ttaagtttgaa	gggggtagttta	aag
agattttttta	gggtatttagt	gagagaagaa	aat
aagaaaagtgt	gaaaagttttt	tttttgggggga	aaa
ataatgtagt	tattatggga	aaatttagatt	tgt
ttgaagtaga	atatgtataa	tgtttataaaa	tat
ttttttttttt	gaaatagagt	tttatttgtgt	tgt
ggtttcgttgt	aatttttgggt	tttttggggttt	aag
agttggggatt	ataggcggttt	attatttatgt	tta
aggggggtttt	attatgtttgg	ttaggatatgg	ttt
tttgggttttt	taaagtgttg	ggattatagg	cgt
tttataataa	tttatgtataa	tagtattttag	ata
aaagttttttt	agaaaattgtt	tttaggttagt	ata
tattataataa	tattttaaaaa	ggtatgtaga	gaa
tagttatttta	gtttttttttt	ttagggggaag	tta
gttgagtttgt	tttttttttcgt	tttgggttttg	cgg
gtaggtagta	ttataataatt	tagtgttttag	ggt
ttagttatagg	tgaggattttt	gttttttttagt	ttt
ttggggtagg	gtagagggttt	agggataaga	att
ttaggggttat	gttggttttat	ttttttgtttat	agt
agaggagggt	atttttttttt	tttgtaagta	ttg
ttttatggta	gttttttttttg	ataaggagggt	ttt
gttggtgtat	aggagttttaa	agtattgggtt	ttg
ggtattgtag	ttgattttatt	gatggatttta	ggt
tttttttgttt	gtaaaaatgat	aaagatatagtt	ttt

10

20

30

40

attagataag gtatgtgaac gttattatag tatagcggtc ggtatttagt aggatttatt 7080

c g a t g a t a g t	t g t t a t c g t t	a t t a t t g t t a	t t a
g t a g t t g g t g	g a g g a g g g a g	a g a t g t c g t g	g g a
t a t t t g g g t t	t g g a g t g t g t	a a g g t a t a t a	t g t
g t g t a a t g t t	a t g t t t t t g a	g t t t t t g a t t	g t a
a t t t t t a g t g	t t a t t t t t g t t	t t g t t t t t t t t	t t t
a a g t g a g t t t	t t t t a a g g g g	t c g g t c g c g t	t t t
t a g g t t a g t g	g a g t g g t a g t	t t t a g a a t t g	g g a
a t t g g g a g t t	g t a t t t t g a g g	t t t a g t t t t t t	g a g
t t t t t t a t t t	t t t g c g t t t t	t t t t t t t t t t c	g g a
t g t t a t t t a c	g g t a g a t a g g	a g g t a a g g g t	g t t
t t t t g t t t g g	g t c g t t t a g g	t g g t t t t a t c	g a g
t g t t t a a g g g	t c g a g g t g t t	t a c g g t a g t t	t t t
g t g a t t t t t c	g t t t t t t c g t t	a g g t a g g t g g	g t t
t t t t t t g t g t	t a t t t a g g t t	t t g a a t t a t t	t a t
t t t c g t t t g t	t t t t t t g t t t	t t a a t t t t t a	t a t
g t t t a t g t g t	g t t t t t a t t t	a g g a t t t t a g	t c g
t a t c g a t t g g	t t t t a t c g t t	t g g t g t t t t g	t a g
g a t t t a g a a t	t t a g g g g a t t	t t t a t g a t t t	g t a
a g a g t t g g t g	g a g t a t t a t a	t t t a g t a g t a	g g g
t a t t t a t t t t	a a g t a t t c g t	t g a a t t g t t t	c g a
t a t t t t c g t t	a t t t t t a a g t	a g g g a t g a g t	c g g
g g g a g a t t g g	t a g t c g g c g t	t g t t t a t t t t	t t a
g t t t t t a a t g	t t t t t t t t t t	t t g t t g t t t t	g g g
a t t t t t t t t a	t t t a a t t t c g	a g g a a g t t a t	a g a
t t g g t c g t t g	t a a t t t a g g t	t t t a t t g g a g	a t a
t c g t g t a g g t	t a g t t t t g t t	g t t a g a a a g t	t t t
t t t c g t t t g t	t t t t t a t t t t	a g t a t a t g t t	a g g
g a t g g g g a t g	a a t g t t t g t t	a a g a t a t t t g	a t g

10

20

30

40

ggtttgtttt gtggggttaa ataggttttc ggtttaaata gagattattg agagtacgat 8820

gtgaagtgtt	tatttgtgta	aagtgtttta	cgt
gtattttttt	tttgtggttt	tttcgatttt	ttt
ggttgggggt	tttgaatgtt	ttttatgata	tta
tgttagattt	ttttagagta	aagggtagcg	gaa
tttgggttaa	gtcgaatttgt	ttttgtcgtg	gat
atgatacggga	attttgtttt	tgttagtttg	tag
gtatttaatat	ttttgggttaa	ggtaattgatt	gaa
agtttttgtgg	tttattttggg	aggtttttttt	ttt
ttttttttgtg	agtttttata	ggttgggtttc	gtg
tcgtaataatt	taggggggttt	ttgggtatcga	gat
ttttgtttttt	agttaggaga	ggaggacggg	ttg
gtaggggtttt	aggagggtttt	tgtagaggag	gtt
agagagagaaa	ggaaggggagg	gtagtgtcgg	ggc
tggaagggtttt	tttgggtgat	tcgtttttagg	agt
gtgagagggtt	ttttttttttta	ggtttttgttg	tgt
tttgcgagaaa	tttgtattttg	ttttttcggtg	gtt
ttgtatggag	attttttttat	tttgggggttt	gag
tttgggggttt	tagttttgttt	ttaggcggtg	ggt
tttgggggggtt	tttcgggttg	agttatttttc	ggg
ggtttttttttt	tttttttttttt	tatttttttgcg	gtt
tttgggttga	ggaaaattttta	taatttttatt	ttt
ttttttttttat	tacgtgggttt	tttgtgggggt	tgg
ggaaagggggt	gtgttttcggg	gaaagggttt	agt
aaatttcgttt	gaatttttggg	ttttttttttta	gtg
ttataattatt	tttttttttag	tgggggttggt	ttt
ttcgttttttt	ttgtgattttg	agttttgtgtg	ttt
ttcgggtttgc	gttttttttttt	gttttttggtt	ttt
agattttattt	ttagtttttttt	tttttttaaat	att

10

20

30

40

tagaggtaggg ttttgggttc gaagttcggg tagaattttg gaggttagga tggtttgaat 10560

t t g g g a g g t c	g a g g t t g t a g	a g a g t t g t a a	t c g
g a g t t t t g g a	a g t t t g t t t t	a g a g t t a g t t	a a g
g c g t t a g t t t	t t t t a t t t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a t t t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g t t t g a	t t t t c g g t t t	t t t t t t g t g a	a t g
t t g g g t t t t a	t t t t t t t t g a	c g t t g t t t t t	t t t
g g g t a g g t a g	a g a c g t t g t t	g t a g g t t a a g	g g c
a g t t t t a g t t	a g t t t g g a g a	t t t c g t g t t t	t t t
t t a g g t t t t t	c g t t t a g g g t	t a t t t a t a t t	a a g
g g c g g g g g a g	t t t t t g t t g a	g g t t t t t g t t	t g t
t t g t t t g g g t	t t g a a t t t a a	g g t t g g g g a t	t t a
g t t t a a t t t g	g t t t t t t t t a	g g g t g g a c g t	t a t
a g t t t t a c g g	a t t t g g t g g a	g t a t t t t t a a g	a a g
t t t g t t t a t t	t g c g g t a g g t	t a g g g g t g g g	t t t
t t t t t t a g a t	g t g a g t t t t t	g g g a t t t t t g	a g t
a g t c g t a t t a	t g t t a c g a g g	g t g a a t g c g g	t t g
a t a a g a a g t a	g g a g t t c g a g	g a t a t a g t t a	a g g
a t g g t g g g g a	t c g g t a g g g t	t g g g g t a g t t	g a g
c g g a t a t t t t	t t t t t t t t t g	t t t a t t t t t g	t t t
a t g g a t g t t t	t t t t t g g g a g	t t g a t g t t t a	t t t
a g t a g g a g g t	g a a g a a t t t g	t a t t a g c g t t	t g g
a g a a t c g t t a	t a a g a a t a t t	t t t t t t t g t g	a g t
a t c g t t t t t g	t t t t a g t t g t	t t t t t t t t a t	t t t
g g g t t a t t t t	t t t a t a t t t t	t t a t a g a g t t	t t t
t t a g a a g t g t	t t t t t t a t t a	t t a g t a g g t a	g g t
a t t t t t t t a t	t t t t t t t a t a	t a g a t g a t t t	t t t
g t t t t a t g g t	t t t t g a g a t t	a g a a t g g t t t	g t t
g t g a g t t t t t	g g t t a a t t t a	g a t t a t t t c g	t t t

10

20

30

40

agtcgagiga tttttaggg acgggatagt aatatcttcg ggttcgatta tattaatgtt 12300

a a t t a t a t t a	a g g t t a g t a g	t g t g g g t t a c	g t g	
t t t g t t t g g t	g g g g g g a t t t	t a g a t t t a g a	g a t	
t g t a t g g g t g	a g g g t g g t a g	t g g t t t a g g g	t t t	
g g g g t g c g t t	t t t t t a c g t t	t g c g t t t a g a	a t t	
a g a t t t a t a t	c g t t a g t t a g	g g t t g t t t g g	a g g	
c g t g g t a g g a	g a a t a g t c g t	g t t a t c g t t a	t g a	10
t a g g g c g t t t	t t t t t t t t t c	g t a t t c g t t t	t c g	
g a g t a g t t a g	a t g t t a g g g t	a g a a a g g g a t	t t t	
a a a t t g a g g g	t t a g t g a t a a	a g t t t c g a t t	a t a	
a t t t t t g g g t	t t t t t t g a g t	t t t a g a t t t a	g g t	
t t g t t t t a t t	t g t t t g t a t t	t a g g t t t t t t	t t g	
a g t t t g t t t t	t t a t t t t g t a	g g t t t t t t t t	a t a	
g a t t t t a t t c	g t g a t a t a a a	t t g g g t t a a g	t t t	20
t t t t g g t t a t	t t t t g g g a t a	a a g t c g t a t t	t t a	
t t t t t t t g a t	t c g t a t g t t t	t t t t t g a a g g	t t t	
a g g t t t t t a g	t t t t t t t t t g	t a t a a g t t t a	t t t	
t a t t t t t g t t	t g g t a g a t g t	t t c g t t t t t g	a a g	
g a a t t t a g g t	t t t g t t t t t t	t t a g g a t t t a	g a g	
t t t t t a g c g c	g g t g t t t t t t	t c g g t t a t t t	g t t	
a t a g a t t g g g	t g t t a t t t g t	g t t t g t g a a g	t t g	30
g t t t g t t t t g	g t a a c g t t t g	t t g a a t g a t a	a a c	
g t t t t a t t a t	t t g t t g g t g g	t t g a t t t g a g	a c g	
a g t t t a t t c g	t t t a t t t a a t	a a a t g t t t g g	g t c	
g g a t t t g g g a	t g g g t t a t a g	t g t t t t g t t t	t g t	
t t a g a a t a a a	t g c g t t t t a t	a t t g g t t c g a	g g t	
t t t t g t g a t t	a a t t g c g g g g	a g t a t g a t a t	a a t	
t t t t t c g t t g	g a t a a t g t g a	g t g g t t t t t a	c g t	40
g g a t t t g t t t	t t t t t t t t g g	t c g g g t a g g g	t g a	

ggggtatiga ttttatgttt tccgttttagg gagatttgat tccggagatt tggattatt 14040

ag t a t t t g a g	t t g g t t c g a t	t a t g g g g t t t	t t a
t g g a t t a g a t	t a a t t a g c g g	t a g g a a a g t t	t g t
g t a g g t g a g g	a t g a t a a t t t	t g a t g g t a g t	a g t
t g t t a t g a g t	t g t t a t a a g t	a a t a t a a a c g	t t a
t t t t c g g t t t	t t t t t g g g t t	t t t t t a t g g t	t t t
t t a g t t t t a t	t t t g g t t t t t	t g t t t g t g g g	t a t
t a t t t c g t t t	a a t t t t g t t a	a a t a t a g a g g	a g g
t t a a g t t a g t	t a g g g t a a g g	t c g g g t a g g t	a t t
c g t t t t t t t t	c g a g g t t t t a	t t t t g t t g g t	t t t
t g t t t t t t a t	t t t t t t t t t t	t t t t t a t c g g	t a g
t t g t t t t t t t	t t t t a g t t t t	t t t a g g t a g t	g t t
g a t g g g t g a t	g t t t t t t t g g	g g t t g t a t a t	a a t
t g a t t a g g a g	a t t t t t g g t a	a g g t g t a g a g	g t g
a t a g g t g a g t	t t a t t g a g t t	g g t t t g g t t t	g g g
t t t t c g t t t a	t t a g t t g t g t	g g t t t t g g a t	a a a
t t t t a t t t g t	a a a a t t a g g a	t t t t a g g g t t	g t c
g t g g t t g g a a	t t t c g t t a g t	t t t t a a a a a t	t g g
t t a g g t a g a g	a a t a g g g g a a	t g g g a a t t t g	t t t
t g g a t t t t a g	g t t t g c g a c g	g t t t t t g g t t	t t t
t g g g a t a g g g	t a a g t c g g t t	g a a t t t a g a g	g t g
t t t t g t t t t g	t g t t t t t t t a	g g g a t a g g t t	t a t
g t t a t a t a t a	t a t t t a t a t a	t t t t t t g a a a	g t t
a a g g a a g t g g	g t g t g g g g g g	t t a t t t t t g a	t a a
t t a g g g t a t t	a g t t t g t t g g	g t t t a g t t g a	g g g
t t g t t t a g g g	t t g g g a a a g g	a g a g a a a t t t	t t t
t t t t g t g t t t	t c g t a t t t t g	t t g t t t t a g g	g t t
g g a a a a g g g a	a g t g a a g t t a	t g t t g a g a g a	c g t
g a g g g t t t a g	g g t a t t t g g g	a g t c g g t a g g	a t a

10

20

30

40

ttcggggtgg gggtagttat ttattaggag tgaggagtcg gcgcgaggag tggaggagg 15780

aaggatggtg	gtagttgggg	agttagcgtt	agt
tatgtagagt	tgggtataatt	tttattatta	ttt
ttattattgg	aggtttaggt	tgttttttgtg	gtg
tttttttttt	cggggagggt	ttgattgggt	ttt
cggtatcggg	cgtataggta	ttattattgt	tat
taagggtgag	gggtattttgg	gggtttgggg	gtg
ttatgtttgg	atttgagggt	tgattgtttt	tta
ttagaagatt	atttagatgg	tgccgggctga	gcg
gtataagttt	atttacgtgg	ttatcgttta	gtt
ggtttttgtag	gtgcgtgtag	agtaggggttt	ggg
gtgtttatttg	gtttttgtttgg	gattattatt	ttt
aagggttagg	agtcggagta	cgggaataatt	att
gttaagggttt	ttcgtattttc	gtttaagtgga	gtg
ttttttttgtt	ttgttttaggt	cgattttttat	ttt
gggattttggg	tttaagtttta	ggttttgggttt	tta
gtgtttatac	gtgtgggtttt	ttgttaggta	tta
ttttgtttttt	taggagttttg	gagtttagtg	tag
gggggtgggta	gagggggaattg	ttagtgtcgg	gtt
aatgtgtttgt	atttggttttt	ttgtatttcgg	ttg
tttgtaataat	aagaataaga	gggaggagaaa	agt
gaagagtaag	ggttttttttta	agagggaagtg	agc
agttttttttg	tttgggtgtt	tttttttggttt	tgt
ttgggtggat	gggggtggtcg	tagtttttatt	ttg
gtttttatttt	taggttttag	ttatttttttt	att
agtttttgatt	ttgtggaagt	atttcgcgat	gga
ttttatttttt	ttgtaattta	aatgggttgta	ttt
agtttagtta	ggtttttaggt	agggttaatt	ttt
tattgtgtgt	cgttttttgag	tttttttggttt	gtt

10

20

30

40



taggaagggt aatigtgtgt gttttcgtgc gtgtttcgcg tgaaagtttc gtttttcgtt 17520  
agacgggacgt ggggtcgggat ttcgttttcgt acg  
ttagttttttt ttttttaaaat ggaggggcgat tat  
atgacgggttg acgataagac ggggtatagtg att  
attaaaagat tatatacgtt agttttagttt agg  
gcgggaaattg agggatagaa aaatttaagta att  
atggaatagtg gaggttggga ttcgaatttta ggt  
atttttggagt tgtagttggg gttatttttta ggg  
gagtttttaga tttgaatttaa gaagagtagt taa  
ttcgggttgcg ttttttttttg cggggaatagg gat  
tagtttttttt tttttattttag gtcgttggtg ttt  
ttgggttgacg tgaagagtggt tttgttttttt gtt  
gggggtttttt tttttattttga aatatattggtg ttt  
tttttaggaag tgttggcggtt tatttttttgga aag  
agagggttggg cgtgtatttat ttagtaaaatt ttt  
atagttttttc gattttttttg aattttaggag gtt

10

20

<210> 6  
 <211> 18404  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> bisulfited genomic DNA

10

<400> 6

ttttttttgat	tagttttttta	agtttttagga	ggt
gggggttttg	taaggatttg	ttgagtaatg	tac
gttgtttag	tttttagg	agtggcggt	agtattttt
gagggatgat	ttttatcggt	180	
tttattttttt	aggatatattag	tgtttttaaat	aaa
aaggaagagg	ggataaaaaaa	taaagtatttt	ttt
taagaggata	agggtagtag	cggttttggat	gag
ttgaggagtt	tgtttttttggt	ttcgttagag	ggg
gtttttcgggt	gttaattatt	tttttttaggt	tag
gattaggggt	ttttttgaggg	tggttttttagt	tgt
gggggttagat	agttttgggtt	cgaatttttag	ttt
gtaagtgaatt	aagttatttta	gtttttttttgt	ttt
tgatagaagt	gttttagattg	aattaacgtg	tgt
agcgtgtgat	gagttatttgt	gttcgttttta	tcg
attatttttgt	tatgatacggt	ttttatttttta	aag
ttatttttttt	acgtgcgagg	cggagttttcg	att
tttacgcgag	gtacgtacgg	aggatatatat	agt
tttattttatt	gggtaagtaa	agggttttaga	ggc
tataagaggga	gaagggttgg	tttttgttttgg	ggt
agagggtgggg	gggatgtagt	tattttaaat	ata
ttgtgagttt	gtttatcgcg	aaatgttttt	ata

20

30

40

```

gggagtgagg gagtgagagg gtagttggaa ttt
gttgggaagt atagaatgag gttgcggtta ttt
aaggatatag ggtagggtag ggaggatatt tag
aggatagtat cgtttatttt tttttgaggg aat
gttgtttttt tatttttttt tttttttttgt ttt
ttttgtgttt gtagtcgggt gtaggggggt aag
tagtataggg ggattcggta ttggtagttt ttt
agttacggtt tttgtatttag attttaagtt ttt
gagtgcgttg ttgggtattta gtagaggttt ata
aatagaaggg gtgagaatta agtttgaatt tga
gttttttttta gaaagtgagg atcgggttgg gta
gtagtiaggg ttatttttt ggacgaggig cgggaggttt tggtaggggt attttttatg 1920
gttggggggat aggtgatgtt ttcgtattttc gat
agggatagtg ggaagggtggt ggttttttagta ggg
tttttttttt ttttagggttt tgttttgtac gta
tggtttttaat gaattgggcg atggttacgt aga
ttatgttcga gcgttgcgtt cgtattatttt gga
ttaggttttg gtgggggggta gttaaatttt agg
tgttttatttt ttattttttaa attttttagggt gtt
tgagtatgtc gatgataatg atgggtgtttg tgc
ggggtgttat tagaggtttag ttaagtttttt ttc
ttaggttttag gtattatagg agtagttttga gtt
ggttatcggg taagtgatga tggagggtttg ttt
ggtttttgcgg tgttgacgtt ggttttttttag ttg
gcgtcgaatt tttaatttttta gtgagtggtt gtt
aatttttatta ttgtttttgtc ggttttttagg tat
ggagttaatgg agcgttttttt agtatgggttt tat
agggaaggga tagtttttgag atagtaggggt gcg
agtagtgtag taggaagttt ttttttttttt tta

```

10

20

30

40

```

t t t t a g g t t t   a t t t t t a g t t   g a g t t t a g t a   a g t
t t a a a t t t a g   a t t g t t a a a a   a t a a t t t t t t   a t a
a a a g g t t a t g   g g g t t t t t a a   g a a g t g t g t g   a a t
a g t t t t c g g g   g a t g g g t t t g   t t t t t g a g a g   a g t
t t t a t c g g g g   g t a t t t t t t a g   a t t t a g t c g a   t t t
g g g g a a g a g g   a g g a a g t t a g   a g g t c g t c g t   a g g
g g a t c g g g g t   a a g g t a g g t t   t t t a t t t t t t   t a t
a g t a a t a g c g   t t t a g t t t t t   g a g g g t t g a c   g g a
t g a g t t t t t a   c g a t a a t t t t   g a g a t t t t t g a   t t t
a a g t t a a g t a   a t t t g t t t t a a   g a t t a t a t a g   t t g
t t t t t t a t t t   a t t t a g g t t a   g g t t a g t t t a   g t g
t t t g t a g t t t   t t a t t t t g t   a t t t a t t a g   a g g t t t t g
t a g a t a g a g g   a g t t a t g t g t   a g t t t t a a a g   a a g
g g t t a g g a t g   g g g t a t t g t t   t g g g g a a g t t   g g g
a a g t t t t g c g   g t t a t c g a t g   g a a a a a g a g g   a g g
t t t t g g g a g a   a g a a a t t a a t   a g a a t g g g a t   t t c
g g t t t a t t g t   g g g t g t t t g t   t c g g t t t t g t   t t t
g g t t t c g g g t   t t t t t t t t t g   t a t t t g g t a g   g g t
t t t t g a g g a a   g a t a t t t a t a   g g t a g a g g g t   t a a
t t t a g g g t t t   t g g a g t t a t g   a g g g g a t t t a   g g a
a a t g t g c g a g   t t a a c g t t t a   t a t t g t t t t a   a a t
t t t t a g t t g t   t a t t a t t a t t   a t t a g g a t t a   t t a
t t t t g c g t g a   g g t a g a t t t t   t t t g t c g t t g   g t t
t t t a g g t t t a   t t g g g g a t t t   t a t g g t c g g g   t t a
t c g a a t t a g g   t t t t t t t a a g   t c g a g g a t a t   a g g
t t t t a t t t a t   t t t a t t t t a t   t c g a t t a g a g   a g g
a a t g g g g t a g   g g c g t g g g g g   t t a t t t a t a t   t g t
g t t t g t a t t c   g g t t g t g t t a   t g t t t t t c g t   a g t
g t t g t a t g t t   t a t t t c g g g t   t a g t a t g g g a   c g t

```

10

20

30

40

ggggatgagg	tatagagtag	ggtattgtgg	ttt
tgtttggtat	cggttttaaat	atttggttgga	tgg
atttggggttt	tcgtttttaga	ttaattatta	ata
tcggtatatt	cgttttgttat	ttaataaacg	ttg
tgtaaatatt	atagtttttat	agatataaat	aat
gagttttatag	agatagggtga	tcggggggaga	tat
cgtaaatTTTT	tttttttaggtt	ttggaggga aa	taa
ttcgggttggtg	tttttttaaaaa	cgagggtatttt	gtt
tttttttagtag	aaaatgagtt	tgtgttaaaga	aag
ttggggggcgg	tgagtttttta	agagaagcgt	gcg
atgtttaggtt	ttagagtgcg	atttttattttt	aaa
tagaaaggaa ggaattigat	ttagtttigig ttacggatgg	gattatttta atggtagtat	5400
agagggtgtt	gtgtagggggg	agttttgtagg	gta
ggtaggggagg	ataggaggggg	tttggaatgta	gat
gatagttttgg	aatTTTgggtt	tggagtttttag	aag
gggttacgtt	gtgtagtcga	gatttttgttta	tta
ttttttattttt	tgagatttttt	tttttgtttttg	gta
gattataagt	acggggggcgg	atgcgggggaa	ggg
tttttcgggtg	gttatgacga	tgatacgggtt	gtt
attgatcgtg	gttttttagat	aatTTTgggtt	ggc
gttttagtagt	tggtttttgga	cgtaagcgtg	gag
tggtttttagta	taggtttttga	attattgttta	ttt
tttgtttttagt	tgttttttgga	tttaggggttt	ttt
gttttttttttt	ttacgtgggtt	tataattgttg	att
gatttcggggga	tgttatttgtt	tcgttttttgt	agg
gggcggagag	gaggcgagat	ggttttgggtt	agt
tttttttgagt	taatagggtta	tttttggtttt	aga
gtagtaggggg	tggggggatta	tttgatatgga	ggg
agtaggggggt	aatTTTgtttg	ttgggtgggtgg	gga

10

20

30

40

```

t t g g a g a a g g   g g g a g g t t t t   g t g g g g g g t g   t g g
t g g a g a t t t t g   t g a g a t g a g g   g g a g g t a g t t   g g g
g t a g t t t t g g g   t g t t t a t a g g   g g a g a a t g t t   t t t
t c g t t g t t t t   t t t a g a c g t t   g g t g t a a g t t   t t t
t g t g g g t g g g   g a a a t g a g t a   t t a g t t t t t a   a a g
g g g t g g g t t a   g g a g t a g a g g   t g g g t a a g g a   g g g
g t t g t t a t t a   t t t t a g t t g t   t t t a g t t t t g   t c g
t t a g a a g t t a   g t t t t g g t t g   t a t t t t c g g a   t t t
g t t t t t a a t g   t t a g t c g t a t   t t a t t t t c g t   g g t
a g a a g t t a g t   a a t t t a g a g a   t t t t a g a a g t   t t a
g g g a g g t a g t   t g g g t t t a t t   t t t g a t t t g t   c g t
t t a a t t t c g t t t t t g a a   a t g t t t t a t t   a g g t t c g t g a   g g t t g t c g a a   g g t t t t t a a a   7140
t t a t t t a t t g   t g t a g c g t t t   a t t t t g g g g g   g a g
g t t t t t t t t t   t t g g g t t t t t   a g t t t t g a a t   t t a
a t a t t g t g g t   t a t a g a t a g g   a g t t t t a g t a   g a g
t c g t a t a t g a   t t t t g a t g t g   g g t g a t t t t g   a g c
t t a t t g a g t a   t a g a a a g t a c   g a a g t t t t t a   g g t
g t t t a g g g t t   c g t t t t t g g t   t t g t a g t a g t   g t t
t g g t a t t a t t   t a g a g a a g g t   a g c g t t a g g g   a a g
t t g a g t a g a g   a t a t t t a t a g   a g a g g g g t c g   g a a
t g c g t t a t a t   g t t t t t a a a t   t t a t t a t t t t   a t t
t a g g t a t g a t   a t t a t t t t t a   t t t t a t a g a t   g a g
g g t t t a g g g t   t t t t g a t t g a   t t t t a g g g t a   a g t
g t g t a g t g g c   g c g g t t a t a g   t t t t t t g t a g   t t t
t t t t t a g a g t   t t t a a t c g g g   t t t c g a a t t t   a g a
g t a a t a t t t a   a a a t a t t t g g   a g g a g a g a a g   t t a
t g t g t t t t a g   t a g a g a t t a g   a g g t a a a g a g   a a a
t g g t g g g a g a   t g g a t a t a t a   g a t t t a a g t t   a t a
a g g g a g g c g g   g g a a g a t a a t   t t t a t t g g g g   a a a

```

10

20

30

40

ttggatgatg	ttattgaagg	ggagttttagg	gtt
tagaaagtag	aattaagttt	tttttttcgaa	gta
ttttataaag	tttagtttta	taggaaatta	cgt
gggagagagt	gagaagtgag	gttgtagagg	ttt
gtaaatTTTT	taatcgtagg	gatgggggga	agg
ttttattttt	gttcggagg	gatttttagtc	gag
gggttatttt	agttttatcgt	ttgggggatag	gtt
gagttttttt	tttttaggttt	taggatgagg	aag
aggaagcgta	gagttatcga	gggatagatg	taa
taaggtagag	gatatagtag	aattttgggag	aaa
gggtgatatt	ggttttttggg	acgggttatt	taa
tttaattttt	cgtttcggta	ttgtttttt	ttttttttt
ttttttttt	ttttttttt	ttttttttt	ttttttttga
8880			
atttaggttt	tagttttttt	tgtagggggt	ttt
taggtattgg	ttagtttcgtt	tttttttttt	ggt
agtttttagag	ggttttcggtg	ttaaaagttt	ttt
taggggggtag	atacggagtt	agttatgtga	ggt
aggtcgaattt	aggaaaggag	gttttttttagg	tgg
tagtttttaag	ttttaatttag	tgtttttgatt	aaa
tttttagagag	gttgtaagt	ggtaggagta	agg
tgaatgtagg	gatttacggt	aagggttaagt	cgg
tttttagcgtt	atttcgttgt	ttttttatttt	aag
gaaaggagtt	atgggtgttat	gaggagtatt	tag
gggagattat	aggaggagtc	ggggagggtta	tag
tgttcgggat	agcgtgagat	atttttatata	ggt
ttttttgtttg	ggtcggagat	ttattttgatt	tta
ttgggataaag	gtatttaagt	tttttggttaag	tat
tttttttattg	ttttaatatg	tgttggggtg	agg
ttagagggaag	aagagttttt	taataataga	gtt
agtggttttt	ttgttttttag	tgggatattgg	gtt

10

20

30

40

c g a g g t a g t t	t t t t g t g g t t	t t t t c g g g g t	t a g
a g a t a t t a g g	t t t t a g g a t a	g t a g g g a g g a	g g g
a g g g g a g g g g	a t g g a g g g t a	g g t a g t g t t g	g t t
t a g g g t g g g a	g t c g g t t t a t	t t t t g t t t g g	g a a
t a t t a g t g g g	a t c g g a g t a g	t t t a g c g g g t	a t t
t t t g t a g g a t	a t t t t g t t g t	t g a g t g t a g t	a t t
t t t t t t t t t t	a t a t a g g t t a	t a g a a a t t t t	t t g
g a t t t t t t a t	t t t g t a g g g t	a t t a g g c g g t	g a g
a g g g t a g g g a	t c g g t t g a g g	t t t t g g g t g g	g g g
a g g g a t g g g g	a g t g t g g g g g	t t g g g g g t a a	g g g
g g g a a t t a g g	a a t g a g t g g t	t t a g g g t t t g	g a t
g g g t t g c g g g	g g g t t a t t t	a t t g a c g g a	g a g c g a g a a g
g g g t t g a g t t	a g g a a g t t a t	t t a t t t t g g t	t t t t g c g a t t
t t t a t t g a g g	t t t c g g t g a a	c g t g g a t a t t	t c g
c g t g g g t a t t	a g g t a t t t t t	a t t a t t t g g g	c g g
t t t t g g g g g t	t t t c g g a g a g	g t t t t t t g t t	t a t
t a g g t a g a g a	g t t t a g g g a t	g a a g g g g g c g	t a g
a t t t t c g g t g	g t t t t a g t t t	t a a g t t t t a g	a t g
g g g g a t a g g a	a g a g g c g c g g	t g g g g t t g t t	a t t
a g t a t a g t a a	g g g a a g a g a a	t c g a t t t t t t	g g g
t t t t a t a c g t	g g g a a g a g a a	g t a g a g t a g g	g t g
g t a g t a a g g a	t t g t a a t t a a	a g g t t t a g g a	g t a
a a t t t a g a c g	t a t a t g t g t g	t t t t g t a t a t	t t t
t t g g t t t a c g	g t t t t a c g g t	a t t t t t t t t t	t t t
t g t c g g g c g t	t t a a t a a t a a	t g a t g g c g g t	g a t
t t t t a t g a a a	t g t g t t a t a a	t g g c g t t t a t	a t g
t t t a a g g t a t	t a g g g g t t a t	t t t t a t t a t t	t t a
t a g t t c g g t t	t g t t t g a g t t	t a t t a g t g a g	t t a
a a t a g a g a t t	t t a a a g t t a g	t g t t t t g a a t	t t t
	a a g a g t t t t t	t t g t t t a a a g	g g g

10

20

30

40



```

taagatttttg ttaatgttttg taagagagaaa ggg
ttgttttatgt tattgtggta gaggggatgga taa
gggtttttttt taatttttttgt ttttaggttt ttg
tttatttttttt ggggggttggg ggataagggtt ttt
tgatttttaga ggtttttaaat attaaagggtat atg
aaatatattaat atcgtttaaat taaaacgagg aaa
atatatatattg gtgggttttttt ttagggaggagg aaa
gagatatatttg gttttttttata tatttttttttg aat
ataaaaaataaa atatgtttaat tgggaataaat ttt
tttttttgtttt ttattttggat gttgttttgta tgg
cgtagtggttt tacgttttgta atttttagtat ttt
gttaggagat cgagattatt ttggtaata tggtaaat tttttttat taaaaatata 12360
aaaaaaatttag ttgggtatatgg tgggtgggcggt ttg
taggagagaatt atttgaatttt aggaagtcga ggt
atttttagtttt ggtaatatag taagattttta ttt
ttgtgtgtttt aatattttatg aatatatatgt atg
ttttaagtttt aataagtttta atttttttttat gat
aaatatattaat gttttttttttt aaaaaagggtt ttt
atttggtttttt ggtttttttttt ttttatattgggt gtt
gtatgggtttta gtttttgattta ttttttttagt ttg
gcgggaattttt tacgttttaac gttaaggaggt aag
gcggggatatatt cgttggcggtt ttcgttttatt tcg
ggatattgagt aagtgttttaa taaataaggtt cgt
agtatatagttt tttgggttttta tatatatagtt ttg
tatagttata gtatatatatat tttattatttt atg
gtatatattttt acgtatggaa tataaaattttg att
gtattaaacg tttattgtat tttaggttttta aga
ggtgggaagg aattaattcg gtatttagaa gaa
tggaagagggt aggaatttttt ttgaagggtg tta

```

10

20

30

40

gtatagttttt	tgttatttttt	tggtaggaaa	ata
gtgtgggggtt	tgtagatttat	ttttatatatat	acg
tgatgtagga	attattttttt	ttattttttttt	atg
aattataaga	gtaaatgttt	gataatttttag	aag
gataaaaagta	gagatttaagg	ttaggcgtag	tgg
ggggggtgagg	ttgggtggatt	atttgatatatt	aag
aaatttttgtt	tttataaaaaa	atataaaaatt	tag
tttaggtatt	tgggagatttg	agatggggagg	atc
agtgagtttat	ggttggtggtta	ttgtaatttcg	gtt
aaaaataaaaa	atatagtttgg	gcgtagtgat	tta
tcgagggtggg	aggattatttt	gaggtttagga	gtt
ttttattttt attagtttgt	aaatttagtt ttttaggagg	iggaggttgt agtgagtcga	14100
gatttatgttta	tcgtatttttta	gttttggggttaa	tag
aattaaaaaat	tatatatagatt	aagatttaattg	gtg
gtaaaataagg	taaaaataatt	tgtagaaagt	ttt
gttttgataaaa	tgagttttaat	aatatattttttt	aaa
agggttttttag	tgtttgtttagt	ttttatatatta	tat
gtaggtgttta	tttatatttaat	tttagaaata	gaa
gtttaagggtt	ataagtttagt	gagtaggaag	gtg
gttttgggtgtt	tttttttttttta	ataattatat	tgt
tgggtatttgt	tatatagttttat	gatggaagggt	gga
tgggttaggg	taaagagggtg	gtacgtatag	agt
aagttatgtg	gttggaggtaa	agttgtttttg	aga
ttaagggttag	gttgagaaat	taaggatgaa	att
tttggttagga	aaatgatttat	agacgggatt	agg
cgggtgggggtc	gatagtgata	agatgtgtat	tgg
taagaatttag	taggggttagg	gagttatttta	ttt
gttggttatttt	ttttttttttttt	ttttttttttttt	ttt
taggttggag	tgtagtgacg	taattttcgggt	tta

10

20

30

40

t a a t t t t t t t	g t t t t a g t t t	t t t t a g t a g t	t g g
g t t t a a t t t t	t t t t t t g t a t	t t t t a g t t g a	g a t
t t t t g a a t t t	t t g a t t t c g t	g a t t t a t t t g	t t t
g t t t g a g t t a	t t a t g t t t a g	t c g g t t g t t a	t t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t c g	a t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t
t t t t t t t g a t	a t a g a a t t t t	g t t t t a t t a t	t t a
t t a t t g t a g c	g t c g a t t t t t	t t g g t t t a g g	t g a
t g a g a t t a t a	g g t g t a t g t t	a t t a t a t t t a	g t t
t c g t a g t a g a	g a t g a g g t t t	t t t t t t a t g t	t g t
a a g t a t t t t t t a t t t t a g	t t t t t a a a t t g t t a g g a t t	a t t a t a t g t t t g g g t t a t t a	15840
t a t t t a g t a t	t t t t t t t t t a a	t a g a g a t g g g	g t t
a t t t t t g a g t	t t a a g t a a t t	t t t t t t t t t t c	g g t
g c g t t a t t t t	a t t t c g t t a g	g t t t t t a t t t	t t a
t g t t g t g g t t	t t g t t t t c g t	t t t a t t a g g g	t t t
t g t t t g t t t t	t a t a t t a g g g	t t t t g t g t t t	a t t
t t t g a t t a t t	a c g t t a t a t g	g t t a g t t t t t	t t t
g t t a t t t t t t	c g g g a a g g t t	t t t t t g a t t t	t t t
g t t a t t t g t t	a g t a t a t g a a	g t t g g t t t a t	t t t
g t t t t a t t t t	g t c g t t t a g g	t t g g t g t g t a	g t g
a t t t t t t a g g	t t t a a g t a a g	t t t t t t a t t t	t a g
t g t g t t a t t a	t a t t t a g t t a	a t t t t t t a t t	t t t
t t a g g t t g g t	t t t a a a t t t t	t g g g t t t a a g	t a a
t g g g a t t a t a	g g t g t g a a t t	a t t a t a t t c g	g t t
t t t g a g a a t t	t g t a a t g a t t	t a a t t t a t t g	g g t
g g a a t g t a a g	t t t c g t g a g a	g t a g a g a t t a	t g t
t a t t t t a a a t	a g t a t t t g g t	g t a t a a t a g a	t g t
g t a g g g g a a a	g g g a a g t g a a	a g g a a a t a a a	g a a

10

20

30

40

```

gtgcggagaa gttggttgga cgtgggaggg ttt
tgagggtgttg tgagttat ttt aggggggatatag gtt
agagggttgga agtagaaaatg taatggagag aat
ttaaagaggg ggtagaggag tatgagtgag tcg
aagttttatag ggatcggaaa taggcgtagg gta
cgtcggagtg agtatttaata aagtttttttt ttt
tcgatgggtgt tcggggatttta tttaacgggat agt
ggcggaggggt cgtaggggggc ggggttgagt tag
ttaggtgagg aagaatcgtt tagtaattag tta
taatggtatt gtagggataa attttggatt aat
gggggttggtt cgagatcgtt tatagcgggtt agt
agtaggttcg ttigtgtt tagggtcgtt tttttcggg agaggaggag ttatttggag 17580
ttttattttgg agttttaagtt gatagagcgg cgg
agtaatttttg gttgagggaag agtaatttaat ggg
agggtttaag gaaaaattttt aatagttttag ttt
ggttttatttta ttttagggcgt tgaggggatttt att
ggggaggagtg ttttaggtagg gtttaggttttt ggg
gggaggagtt gtttagggggg atgggggttttg gaa
tgggggttgt taggttcgta agagattgat att
ttgttttggaa tattaagggtt ttttttttttt ttgg
aggaggcgggt tacgttgttta ttagtagtag gtt
gaaatagcgt ttttagtttg tttgatagggt ttgg
atttgattaa gcgagtaaat ttaaggatat ttg
ttttaaggat tagcgtgttt aagataatttg gag
ttttttatttg ttgggtagtt gtttgttaaa tag
gttttggaatga tgataatttgg ttatatatttg gta

```

10

20

30

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 7

caggccagtg gagtggcag

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 8

gaggaggtgc agctagtctg

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 9

caggccagtg gaggtaggcagc cccagaactg gga  
actgggagct gcatctgagg cttagtcctt gag  
ctcctc

30

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

caaagcactg gcttttggaac c

10

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

20

<400> 11

atcgagtgag tcctgctgga t

30

<210> 12

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

caaagcactg gcttttggaac cggactgtct ggg  
actgatggac tcaggcaatg ccttaaactc cctgagcctc aggttccttg tctgtaaaat 120

40

gataaagata gcccctgttt catagggctg tgg  
aacgccatta tagcacagcg cccggcatcc agc

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

tgtctggagg ccacgggtcaa tga

20

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gtttgtattc ggttgtgtca tgctc



<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 15

cccagttcat tgaaaccact

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

30

<400> 16

ccttgctctt ctccttgtct

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

40

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 17

10

gaacggttatt atagtatagc gttc

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequ  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 18

30

tcacgcatac gaacccaaac g

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

40

&lt;400&gt; 19

gaacgccatt atagcacagc gcccgggcatt cag  
cgccatcatt gttatttagcg tggggccaggg agg  
ggagagatgc cgtgggaccg tctggggttcg cat

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子ゲノムDNAのセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

50

【図 2】図 1 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 3】図 1 ・ 図 2 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 4】図 1 ～ 図 3 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 5】図 1 ～ 図 4 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 6】図 1 ～ 図 5 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

10

【図 7】図 1 ～ 図 6 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 8】図 1 ～ 図 7 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 9】図 1 ～ 図 8 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 0】図 1 ～ 図 9 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 1】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

20

【図 1 2】図 1 1 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 3】図 1 1 ・ 図 1 2 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 4】図 1 1 ～ 図 1 3 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 5】図 1 1 ～ 図 1 4 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 6】図 1 1 ～ 図 1 5 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

30

【図 1 7】図 1 1 ～ 図 1 6 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 8】図 1 1 ～ 図 1 7 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 1 9】図 1 1 ～ 図 1 8 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 2 0】図 1 1 ～ 図 1 9 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 2 1】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子の c D N A の塩基配列を示す塩基配列図である。

40

【図 2 2】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 蛋白質の概略構造を示す模式図である。

【図 2 3】図 2 2 に示す S H P 1 蛋白質のアミノ酸配列を示すアミノ酸配列図である。

【図 2 4】図 1 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A (センス鎖)において、C p G 島でメチル化される C G 配列の部位を示す塩基配列図である。

【図 2 5】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理にて、シトシンがウラシルに変換される過程を示す化学反応説明図である。

【図 2 6】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理により、シトシンがウラシルへ変換され、メチル化されたシトシンが変換されない状態を示す模式図である。

50

【図 27】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子ゲノム D N A のセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 28】図 27 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 29】図 27・28 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 30】図 27～図 29 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 31】図 27～図 30 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

10

【図 32】図 27～図 31 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 33】図 27～図 32 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 34】図 27～図 33 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 35】図 27～図 34 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 36】図 27～図 35 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

20

【図 37】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子ゲノム D N A のアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 38】図 37 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 39】図 37・図 38 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 40】図 37～図 39 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 41】図 37～図 40 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖 30 に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 42】図 37～図 41 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 43】図 37～図 42 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 44】図 37～図 43 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 45】図 37～図 44 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 46】図 37～図 45 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖 40 に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 47】( a ) ～ ( d ) は、それぞれ本発明で用いられるメチル化特異的 P C R のステップを示す模式図である。

【図 48】( a ) ・ ( b ) は、本発明の実施の一例である実施例 1 において用いられる P C R 用プライマーを示す塩基配列図であり、( c ) は、( a ) ・ ( b ) で用いられる P C R 用プライマーが認識する S H P 1 遺伝子 ( ゲノム D N A ・ センス鎖 ) の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 49】( a ) ・ ( b ) は、本発明の実施の一例である実施例 2 において用いられる P C R 用プライマーを示す塩基配列図であり、( c ) は、( a ) ・ ( b ) で用いられる P C R 用プライマーが認識する S H P 1 遺伝子 ( ゲノム D N A ・ センス鎖 ) の塩基配列を示す 50

【図 50】 (a)・(b) は、本発明の実施の一例である実施例 3 において用いられる R-T-PCR 用プライマーを示す塩基配列図である。

【図５２】（ａ）・（ｂ）は、本発明の実施の一例である実施例５において用いられるメチル化特異的ＰＣＲ用プライマーを示す塩基配列図であり、（ｃ）は、（ａ）・（ｂ）で用いられるメチル化特異的ＰＣＲ用プライマーが認識するＳＨＰ１遺伝子（ゲノムＤＮＡ・センス鎖）の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 53】 (a) は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を示す 10  
図であり、(b) は、ALL 患者における SHP1 遺伝子の異型接合性喪失の解析結果の  
一つの典型的なデータを示す図である。

oatutagtt	gtgocogtg	taguonast	gtoutctoo	asacocacg	gacagagz	60
otgatogct	outtitttg	asagotgag	oagpogtg	agagagagt	ttgtottg	120
aatocoooc	ootacogtg	ttattagaa	gtgttcttt	agagagag	ttgatcttg	180
atctctctt	gacagtctc	ttatgttgc	tgtgttgtt	aatgtatct	asagooacga	240
tootgatgt	gacgaotgt	caggagagct	gaaggttgt	tttgtgcgc	ootatgcgt	300
gacococct	gzzcttgtt	otgtatagc	catagocgc	tootpaggt	gtacootoc	360
tttgtctgt	gocagagag	gaagagctgt	gattgttgc	acatatact	atgtatgtt	420
acattagct	ttgttgtgt	otctatagc	ootagacac	ootatctot	otctootgt	480
tcctctgtc	tttccaggg	coctococct	gaagotctc	tootattgt	ootgtatgt	540
atctacotg	coocagagc	tasocctac	ttagatctt	cocttccoc	caggagagt	600
tgatgtgt	gattgttgt	otctagocg	ttgtttgtt	gtctgcac	gagatctct	660
oottttgtc	gagatgtgc	ttttatagt	tttctttgt	ootcttgtt	ttctgttgt	720
gagatttgt	cooctttgt	ttgttttgt	cagagctgt	tatttttgtt	ttgtttctc	780
taocagatc	coogcogctg	ttgtatgtt	agttctagt	gagatctgc	gtgtatctc	840
ootctocgg	gagagtgct	ootgtcagc	caggagocgc	ttctttctc	ocgttttgt	900
gtctagagc	gtatgcgtc	ttatgttgt	otctagocg	coctccocct	atgtctctt	960
tocttagag	tattatgtc	gatttttgt	otctagctc	attgtctgc	cagcagatc	1020
CAGAGAGAA	GTGTGTATT	ATGACAGCT	TTGCTGTAC	CTGCTTGGC	CACAGTTGA	1080
CAGCTGTGC	ATGATGTCA	CGCCGCCGC	TGCGGCCGC	CGCTTGTCT	TCCCTCTCC	1140
TAGAGAGAA	TGTTTTCGC	TGTttagtt	oaggtaccc	tttgttgtt	agttcttgt	1200
ttatttttg	gatttttgt	ttgttttgt	ttgttttgt	gacttttgt	agcttttgt	1260
cgatcttgt	otctatgtc	ootttttgt	gtcttttgt	ootttcttt	coogagagt	1320
gtatagatc	oagctatct	catgtttgt	tgcccttgt	ttctattgt	ootctgtgc	1380
agtttgtat	ttgttttgt	attgtttgt	ttcttttgt	otcttttgt	otcttttgt	1440
oottttgtt	gtcttttgt	oottttgtt	otcttttgt	otcttttgt	gacttttgt	1500
gacococgc	agagcttct	oagcttgtc	caattttgt	gtcttttgt	actatagct	1560
ttgttttgt	otcttttgt	toottttgt	ttactttgt	otctattgt	catctagac	1620
gtctattgt	agcttttgt	atgttttgt	gtcttttgt	gtcttttgt	atcttttgt	1680
gacacagac	gacttttgt	otcttttgt	agcttttgt	ttcttttgt	agtttttgt	1740
cagacagct	asoccttgt	attgtttgt	ttcagttgt	cagatttgt	oagcagac	1800
gtctagctt	gtcttttgt	ttgttttgt	caactttgt	coagcttgt	ttagattgt	1860
agctagagc	attgtttgt	coagcttgt	ttagcagag	otctcagat	ttatgttgt	1920
otcttttgt	asacttttgt	acttttgt	atttttgt	atttttgt	gttttttgt	1980

otatagagag	gotagagag	gagagagag	ttagagagag	agagagagag	ttagagagag	2040
gatagatag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	agagagagag	toagagagag	2100
aanaganaa	aanagagag	oagagagag	ttagagagag	ttagagagag	ttagagagag	2160
atagatagat	gagagagag	ttagagagag	oagagagag	ttagagagag	gagagagag	2220
agatagagag	aanagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	gagagagag	2280
gagagagag	ttagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	gagagagag	2340
oagagagag	oagagagag	ttagagagag	gagagagag	oagagagag	oagagagag	2400
oagagagag	ttagagagag	oagagagag	gagagagag	oagagagag	oagagagag	2460
oagagagag	oagagagag	gagagagag	ttagagagag	gagagagag	oagagagag	2520
oagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	gagagagag	oagagagag	2580
ttagagagag	oagagagag	gagagagag	ttagagagag	oagagagag	gagagagag	2640
gagagagag	oagagagag	gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	2700
toagagagag	ttagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	ttagagagag	2760
agagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	gagagagag	ttagagagag	2820
gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	2880
gagagagag	gagagagag	gagagagag	oagagagag	gagagagag	oagagagag	2940
oagagagag	gagagagag	gagagagag	oagagagag	gagagagag	oagagagag	3000
oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3060
gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3120
ttagagagag	gagagagag	gagagagag	oagagagag	oagagagag	ttagagagag	3180
gagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3240
oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3300
gagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	gagagagag	3360
oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3420
gagagagag	ttagagagag	gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3480
oagagagag	oagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	3540
oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3600
oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3660
gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3720
gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3780
gagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3840
oagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	oagagagag	3900
oagagagag	oagagagag	oagagagag	ttagagagag	oagagagag	oagagagag	3960

【 図 3 】

1234567891011121314151617181920212223242526272829303132333435363738394041424344454647484950515253545556575859606162636465666768697071727374757677787980818283848586878889909192939495969798991001011021031041051061071081091101111121131141151161171181191201211221231241251261271281291301311321331341351361371381391401411421431441451461471481491501511521531541551561571581591601611621631641651661671681691701711721731741751761771781791801811821831841851861871881891901911921931941951961971981992002012022032042052062072082092102112122132142152162172182192202212222232242252262272282292302312322332342352362372382392402412422432442452462472482492502512522532542552562572582592602612622632642652662672682692702712722732742752762772782792802812822832842852862872882892902912922932942952962972982993003013023033043053063073083093103113123133143153163173183193203213223233243253263273283293303313323333343353363373383393403413423433443453463473483493503513523533543553563573583593603613623633643653663673683693703713723733743753763773783793803813823833843853863873883893903913923933943953963973983994004014024034044054064074084094104114124134144154164174184194204214224234244254264274284294304314324334344354364374384394404414424434444454464474484494504514524534544554564574584594604614624634644654664674684694704714724734744754764774784794804814824834844854864874884894904914924934944954964974984995005015025035045055065075085095105115125135145155165175185195205215225235245255265275285295305315325335345355365375385395405415425435445455465475485495505515525535545555565575585595605615625635645655665675685695705715725735745755765775785795805815825835845855865875885895905915925935945955965975985996006016026036046056066076086096106116126136146156166176186196206216226236246256266276286296306316326336346356366376386396406416426436446456466476486496506516526536546556566576586596606616626636646656666676686696706716726736746756766776786796806816826836846856866876886896906916926936946956966976986997007017027037047057067077087097107117127137147157167177187197207217227237247257267277287297307317327337347357367377387397407417427437447457467477487497507517527537547557567577587597607617627637647657667677687697707717727737747757767777787797807817827837847857867877887897907917927937947957967977987998008018028038048058068078088098108118128138148158168178188198208218228238248258268278288298308318328338348358368378388398408418428438448458468478488498508518528538548558568578588598608618628638648658668678688698708718728738748758768778788798808818828838848858868878888898908918928938948958968978988999009019029039049059069079089099109119129139149159169179189199209219229239249259269279289299309319329339349359369379389399409419429439449459469479489499509519529539549559569579589599609619629639649659669679689699709719729739749759769779789799809819829839849859869879889899909919929939949959969979989991000100110021003100410051006100710081009101010111012101310141015101610171018101910201021102210231024102510261027102810291030103110321033103410351036103710381039104010411042104310441045104610471048104910501051105210531054105510561057105810591060106110621063106410651066106710681069107010711072107310741075107610771078107910801081108210831084108510861087108810891090109110921093109410951096109710981099110011011102110311041105110611071108110911101111111211131114111511161117111811191120112111221123112411251126112711281129113011311132113311341135113611371138113911401141114211431144114511461147114811491150115111521153115411551156115711581159116011611162116311641165116611671168116911701171117211731174117511761177117811791180118111821183118411851186118711881189119011911192119311941195119611971198119920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094194294394494594694794894995095195295395495595695795895996096196296396496596696796896997097197297397497597697797897998098198298398498598698798898999099199299399499599699799899910001001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110111021103110411051106110711081109111011111112111311141115111611171118111911201121112211231124112511261127112811291130113111321133113411351136113711381139114011411142114311441145114611471148114911501151115211531154115511561157115811591160116111621163116411651166116711681169117011711172117311741175117611771178117911801181118211831184118511861187118811891190119111921193119411951196119711981199200201202203204205206207208209210211212213214215216217218219220221222223224225226227228229230231232233234235236237238239240241242243244245246247248249250251252253254255256257258259260261262263264265266267268269270271272273274275276277278279280281282283284285286287288289290291292293294295296297298299300301302303304305306307308309310311312313314315316317318319320321322323324325326327328329330331332333334335336337338339340341342343344345346347348349350351352353354355356357358359360361362363364365366367368369370371372373374375376377378379380381382383384385386387388389390391392393394395396397398399400401402403404405406407408409410411412413414415416417418419420421422423424425426427428429430431432433434435436437438439440441442443444445446447448449450451452453454455456457458459460461462463464465466467468469470471472473474475476477478479480481482483484485486487488489490491492493494495496497498499500501502503504505506507508509510511512513514515516517518519520521522523524525526527528529530531532533534535536537538539540541542543544545546547548549550551552553554555556557558559560561562563564565566567568569570571572573574575576577578579580581582583584585586587588589590591592593594595596597598599600601602603604605606607608609610611612613614615616617618619620621622623624625626627628629630631632633634635636637638639640641642643644645646647648649650651652653654655656657658659660661662663664665666667668669670671672673674675676677678679680681682683684685686687688689690691692693694695696697698699700701702703704705706707708709710711712713714715716717718719720721722723724725726727728729730731732733734735736737738739740741742743744745746747748749750751752753754755756757758759760761762763764765766767768769770771772773774775776777778779780781782783784785786787788789790791792793794795796797798799800801802803804805806807808809810811812813814815816817818819820821822823824825826827828829830831832833834835836837838839840841842843844845846847848849850851852853854855856857858859860861862863864865866867868869870871872873874875876877878879880881882883884885886887888889890891892893894895896897898899900901902903904905906907908909910911912913914915916917918919920921922923924925926927928929930931932933934935936937938939940941942943944945946947948949950951952953954955956957958959960961962963964965966967968969970971972973974975976977978979980981982983984985986987988989990991992993994995996997998999100010011002100310041005100610071008100910101011101210131014101510161017101810191020102110221023102410251026102710281029103010311032103310341035103610371038103910401041104210431044104510461047104810491050105110521053105410551056105710581059106010611062106310641065106610671068106910701071107210731074107510761077107810791080108110821083108410851086108710881089109010911092109310941095109610971098109911001101110211031104110511061107110811091110111111121113111411151116111711181119112011211122112311241125112611271128112911301131113211331134113511361137113811391140114111421143114411451146114711481149115011511152115311541155115611571158115911601161116211631164116511661167116811691170117111721173117411751176117711781179118011811182118311841185118611871188118911901191119211931194119511961197119811992002012022032042052062072082092102112122132142152162172182192202212222232242252262272282292302312322332342352362372382392402412422432442452462472482492502512522532542552562572582592602612622632642652662672682692702712722732742752762772782792802812822832842852862872882892902912922932942952962972982993003013023033043053063073083093103113123133143153163173183193203213223233243253263273283293303313323333343353363373383393403413423433443453463473483493503513523533543553563573583593603613623633643653663673683693703713723733743753763773783793803813823833843853863873883893903913923933943953963973983994004014024034044054064074084094104114124134144154164174184194204214224234244254264274284294304314324334344354364374384394404414424434444454464474484494504514524534544554564574584594604614624634644654664674684694704714724734744754764774784794804814824834844854864874884894904914924934944954964974984995005015025035045055065075085095105115125135145155165175185195205215225235245255265275285295305315325335345355365375385395405415425435445455465475485495505515525535545555565575585595605615625635645655665675685695705715725735745755765775785795805815825835845855865875885895905915925935945955965975985996006016026036046056066076086096106116126136146156166176186196206216226236246256266276286296306316326336346356366376386396406416426436446456466476486496506516526536546556566576586596606616626636646656666676686696706716726736746756766776786796806816826836846856866876886896906916926936946956966976986997007017027037047057067077087097107117127137147157167177187197207217227237247257267277287297307317327337347357367377387397407417427437447457467477487497507517527537547557567577587597607617627637647657667677687697707717727737747757767777787797807817827837847857867877887897907917927937947957967977987998008018028038048058068078088098108118128138148158168178188198208218228238248258268278288298308318328338348358368378388398408418428438448458468478488498508518528538548558568578588598608618628638648658668678688698708718728738748758768778788798808818828838848858868878888898908918928938948958968978988999009019029039049059069079089099109119129139149

【图 8】

GTCCGCGGCTG	GACAAATgta	gtacgcccc	ggaattgccc	cccttcgggg	gtccctccct	13829
ggcctttctg	tcctctcttg	tcagcttggg	tgagctatgt	gaggttatgt	gagagagagg	13890
gagcagctga	ccactatgtc	tcacttgatg	CGAAAGTGA	TCGGGAGATG	TGGCATATCC	14040
AGTACGATG	CTACGCGCAC	CATGAGGCTG	CGAGTAAGCC	TGGGGGATGT	CTGACATGCT	14100
TGACACAGAT	CACCCAGCAG	CGAGAAATGT	TCGCTADACC	AGGCGCCATG	ATGCATGCAT	14160
GCAGStgagg	gtgatantcc	tgctagtgt	agtgcacgt	gagagctaga	tcagtctagg	14220
tgcactgag	tgattatag	actatanaag	tcagctagc	actattggg	cctgcctctga	14280
cccgcctgtt	ctctagcttc	ccctcactgg	tacgaaccc	tgagtgatga	tgctaggaga	14340
ccagcggccc	tttgagcttc	tgctcttggg	ttctctcttc	agagcctctt	cggatctagg	14400
ctctctctgg	aacctctgca	actataggag	tttggcctgg	gacacatttc	ctgcgcctgg	14460
ccagactagt	cagggcagag	ccctcaggag	ccccaccta	gaccttggc	cctgcctgct	14520
ccctttctct	cgagctcttc	ttctcttggg	tcctctcttc	agagactctt	atggagcctt	14580
tcctccactc	tcctctcttc	ttctctcttc	tcctcagag	tcagcttggt	ctctctggtt	14640
ctgacctctc	tcctcagctc	ccccagctgt	gccccctct	gccccccctc	actatctggg	14700
ctagtctgt	gctttcttg	ccctccactc	aacctctctg	tcctctcttc	ccgacttggg	14760
tgctcaggag	acotcttgta	agctcagag	tgctctctg	ccacagagag	caggcttctc	14820
ccagctggag	ccactgatgt	gctctctct	gactatctga	gcagctgag	gtgcagcccg	14880
ctctctctga	ccctctcttc	ctgtctggag	caactctctc	actctctctc	ccctctggtt	14940
ctctctctgt	aacctcagga	ctctctcttc	ctgtctgaga	ctctctctga	ctctctctgt	15000
tcagctctga	tcctctcttc	ctctctcttc	ctgtctcttc	tcacttggg	ctctctctca	15060
tgctcagag	actatggaga	ctgtctcttc	ccctctcttc	gctctctctc	actctctctg	15120
tgctcccgag	gcctctggag	ctctctcttc	ctctctcttc	ccccccagag	ctgttctgtc	15180
ttggccctgg	ccactctggt	gactctcttc	gctctctctc	tgagcttctg	agagccctga	15240
ctctctctgt	tcctctcttc	ctgtctcttc	ccctctcttc	gctctctctc	ctgtctcttc	15300
gcccacctca	ccctctctca	ctctctcttc	gcccccttc	ctttattgt	acgtctctga	15360
agcagctgtg	gtctctcttc	ctttctttg	ctactctgt	tgactctgt	accagcgagc	15420
tcagctctgt	agctctcttc	gctctctctc	gctctctctc	tgagcttctg	tgagcttctg	15480
ttgcggccag	ctgtctcttc	agcagctctt	ctctctcttc	tcctctcttc	actccctctg	15540
ctctctcttc	ccctctcttc	ctgtctcttc	ctctctcttc	ctctctcttc	aggtctctga	15600
gagcagctga	agctctcttc	tcctctcttc	ccctctcttc	ctctctcttc	gagcagctga	15660
tcctctcttc	agctctcttc	ccccagctga	gcttctcttc	gattctcttc	tcctctcttc	15720
tcctctcttc	agcagccctc	tcctctcttc	tgagctctgt	gcctctcttc	tgagcagctga	15780
aacctctgtg	ccactctctc	ccccagctga	ccccccagag	ccccccagag	agcactcttc	15840

【図 10】

atgagacat	gaggatg	ttagaacgc	gagtgctg	ccacagagc	caacactctt	17885
acccatgat	tgcagctg	gcacacatg	ttagagcgc	gctacacac	ccacatgat	17940
ctgtagcga	tgtagcaca	gagtagctg	taacagcgc	gagtagcga	ctgtagcgc	18000
ccacagctg	tcacatctg	ggcagacac	gacagctg	tacagacgc	ccacagcgc	18060
cagcatctg	cccatctag	gcagctgct	ctctatctg	attagcaga	atttagcga	18120
ctgctgacg	tgaagctgc	ttgtttttt	gtccctctt	ccctccccc	tgtagcgat	18180
gctgtttct	ctttttttt	caacatctg	tgctggag	tacacggct	ggagctctg	18240
cccttgag	tgtctggcg	acactctg	gagctgag	gagcacctg	ccacagcgc	18300
agagctg	gtgctctg	tacagacac	ctttacacg	ccacagctg	acagctgac	18360
acacccccc	gaactctg	actctctg	gttatctgc	gag		18420

## 【圖 11】

totoctotao	oagotoota	agtooaaga	agtooaaga	otagtaao	otagtaao	60
agagototao	taagtaotg	otagtaotg	oagooagoo	otagtaotg	agagototg	120
gotototao	ootatooag	agtagaagoo	oagoototg	gagagotao	toooagoo	180
tatatotoo	agagooagoo	tattatoot	agagagaga	oooototg	gagagagao	240
agagagagao	agagagagao	oagagotao	ttoagtoag	oagototao	aaatootao	300
oagagagao	agagagagao	oagototg	gagagagagao	gagagotg	ooagototg	360
otagagagao	tatoototg	ooagagagao	gagagagao	oagototg	taagototg	420
totagototg	gatatootg	ototatag	gagagagao	agagagotg	agagagotg	480
gagagagao	oooototg	tegooaagoo	gagagagao	gagagagao	gagagotg	540
gagagagao	agotagagag	oagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	600
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	660
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	720
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	780
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	840
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	900
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	960
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1020
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1080
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1140
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1200
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1260
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1320
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1380
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1440
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1500
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1560
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1620
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1680
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1740
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1800
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1860
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1920
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	1980
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2040
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2100
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2160
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2220
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2280
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2340
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2400
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2460
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2520
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2580
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2640
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2700
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2760
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2820
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2880
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	2940
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3000
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3060
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3120
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3180
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3240
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3300
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3360
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3420
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3480
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3540
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3600
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3660
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3720
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3780
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3840
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3900
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	3960
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4020
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4080
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4140
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4200
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4260
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4320
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4380
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4440
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4500
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4560
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4620
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4680
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4740
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4800
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4860
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4920
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	4980
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5040
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5100
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5160
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5220
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5280
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5340
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5400
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5460
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5520
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5580
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5640
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5700
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5760
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5820
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5880
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	5940
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6000
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6060
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6120
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6180
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6240
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6300
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6360
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6420
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6480
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6540
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6600
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6660
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6720
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6780
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6840
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6900
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	6960
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7020
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7080
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7140
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7200
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7260
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7320
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7380
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7440
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7500
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7560
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7620
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7680
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7740
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7800
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7860
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7920
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	7980
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8040
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8100
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8160
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8220
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8280
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8340
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8400
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8460
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8520
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8580
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8640
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8700
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8760
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8820
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8880
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	8940
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9000
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9060
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9120
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9180
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9240
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9300
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9360
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9420
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9480
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9540
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9600
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9660
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9720
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9780
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9840
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9900
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	9960
gagagagao	agagagagao	gagagagao	oagagagao	oagagagao	gagagotg	10020

## 【图 12】

[illegible]

【例 13】

gxttoozgo	tootootot	tuttizgoz	gxttzgoz	gxtztaot	oogazgzz	4020
ototggtta	gxttoozot	gxtgaggo	oogatzgzz	gxtzttoog	oogotgto	4080
oogazggtt	tgaggoogt	gxtggooos	gxtggtgo	gaggtgoz	gaggtgoz	4140
gxtgaggtt	gxtotgtta	tattgtott	oagagtgat	gxttggtgo	gxttggtgo	4200
ttoagotgt	oagotagot	oagotgta	ttoototoo	gttgcagtt	oatattggt	4260
oottgottta	gxtgacttt	oottgoott	gittgttgo	tgcaagagc	tgagagacc	4320
oagaggtta	gtttgoott	gattggtgo	gxtgactga	tattgttgt	gagagattg	4380
oagattggt	ttotgootg	oogagotgt	oagagtggt	oootooto	tootogagz	4440
oootoatgt	otootoogt	oogagooaz	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4500
gxtgaggtt	gxtgaggtt	oagotggtt	ttotgagoo	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4560
gtttgtatt	gtttgtatt	gtttgtatt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4620
gtttgtatt	oagotggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4680
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4740
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4800
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4860
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4920
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	4980
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5040
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5100
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5160
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5220
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5280
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5340
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5400
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5460
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5520
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5580
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5640
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5700
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5760
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5820
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5880
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	5940
gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	gxtgaggtt	6000

## 【图 14】

ttgacagaca	caagagacota	aacocagatoca	coothacococa	tgacagacota	ogagotagoca	6000
tttgacagaca	tgatotagoca	ttatagatoca	coocacococa	caggagacota	oacagagacoca	6020
gacotacota	caacagatoca	oacagotoca	ootttgatgt	agttagacat	gatgatagat	6100
gaacocagaca	ttgatagatgt	ogotocotoca	agagatagat	gacotgtagat	atagagagat	6180
gagagagaca	gagagagatgt	gtatagatgt	agagagagaca	tacacacoca	tgatagagaca	6240
oatocagaca	tacacagacoca	ttatgtagat	agagagacat	agagotagat	agagatagat	6300
gacagagaca	tgagagatoca	ttatgtagat	agagagagat	agagatagat	agagatagat	6360
agagagacat	aacotgtagat	gtatagatgt	agagagacat	agagagagat	agagagagat	6420
ttgagagaca	agagagatgt	gtatagatgt	agagagagat	agagagagat	agagagagat	6480
tacagagat	tacagagatgt	agagagatgt	agagagagat	agagagagat	agagagagat	6540
gagagagat	tgatocagat	gagagagatgt	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6600
gacotgtagat	tgacagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6660
tgatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6720
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6780
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6840
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6900
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	6960
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7020
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7080
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7140
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7200
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7260
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7320
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7380
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7440
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7500
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7560
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7620
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7680
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7740
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7800
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7860
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7920
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	7980
gtatagatgt	gagagagat	tgatagagat	gtatagagat	gtatagagat	gtatagagat	8040



【图 16】

7980  
8040  
8100  
8160  
8220  
8280  
8340  
8400  
8460  
8520  
8580  
8640  
8700  
8760  
8820  
8880  
8940  
9000  
9060  
9120  
9180  
9240  
9300  
9360  
9420  
9480  
9540  
9600  
9660  
9720  
9780  
9840  
9900

0960  
0020  
0080  
0140  
0200  
0260  
0320  
0380  
0440  
0500  
0560  
0620  
0680  
0740  
0800  
0860  
0920  
0980  
1040  
1100  
1160  
1220  
1280  
1340  
1400  
1460  
1520  
1580  
1640  
1700  
1760  
1820  
1880

## 【图 18】

11940  
12000  
12060  
12120  
12180  
12240  
12300  
12360  
12420  
12480  
12540  
12600  
12660  
12720  
12780  
12840  
12900  
12960  
13020  
13080  
13140  
13200  
13260  
13320  
13380  
13440  
13500  
13560  
13620  
13680  
13740  
13800  
13860

13920  
13980  
14040  
14100  
14160  
14220  
14280  
14340  
14400  
14460  
14520  
14580  
14640  
14700  
14760  
14820  
14880  
14940  
15000  
15060  
15120  
15180  
15240  
15300  
15360  
15420  
15480  
15540  
15600  
15660  
15720  
15780  
15840

## 【 図 1 9 】

tmoocagat tttttttt tagatgag gtatgtat gtgocagc atgtttta 15900  
 atootagag tagagatc ttoocotto gacotocaa atgtgtgaa toacagagt 15960  
 gogocooto atgtgtgag gttttatgt toacatoot agtotoocaa tttgtatagc 16020  
 tttgtgtgag atgtgtgag toacatgag tttgtgtgag atgtgtgag gtatgtttt 16080  
 tttgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16140  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16200  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16260  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16320  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16380  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16440  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16500  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16560  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16620  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16680  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16740  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16800  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16860  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16920  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 16980  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17040  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17100  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17160  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17220  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17280  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17340  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17400  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17460  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17520  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17580  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17640  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17700  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17760  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17820

## 【 図 2 0 】

atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17880  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 17940  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18000  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18060  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18120  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18180  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18240  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18300  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18360  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 18404

## 【 図 2 1 】

atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 60  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 120  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 180  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 240  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 300  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 360  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 420  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 480  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 540  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 600  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 660  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 720  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 780  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 840  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 900  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 960  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1020  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1080  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1140  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1200  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1260  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1320  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1380  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1440  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1500  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1560  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1620  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1680  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1740  
 atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag atgtgtgag 1794

## 【 図 2 3 】

MVRVFRDLGLDAETLLKGRGVHGSFLARPFRKNQGDLSVRVGDQVTHIRIQNSG  
 DFYDLYGGEKFAITLVEYYTQQQGLDQRDGTIHLKYPLNCSPTSERWYHGHMSG  
 GQAEITLLQAKGEFWTLVRRESLBPQDFVLSVSDQPKAGQSPRLRVTHIKVMCEGGRY  
 TVGGLETDFSLDLVEHFQKTGIEEASGAFVYLRQPYATRVNAADENRVLELNKKQDESE  
 DTAKAGFWEFEESLQKQEVKNLHQRLEGQRPNKGNRYNKLFFDHSRVLQGRDSN  
 PGSDYINAYIKNQLLGPDENAKTYIASQGLLEATVDFWQMAWQENSRVIMTTREVE  
 KGRNKCVPYWEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKRLTLQVSPLDNGDLIREWHYQ  
 YLSWPDHGVPEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIVHCBSAGIGRTGIIVDMLENIST  
 KGLDCCDIDQKTIQMRACRSQMVQTEAQYFYVIAQFIETTKKKLEVLQSKQDESEY  
 GNITYPAMKQAHAKASRTSSKHEDVYENLHTKNKREKVQKRSADKESKSLKRLK

## 【 図 2 2 】

N				C			
SH2	SH2	PITPase Domain	C-terminal	SH2	SH2	PITPase Domain	C-terminal



## 【圖 30】

4020  
4060  
4140  
4200  
4260  
4320  
4380  
4440  
4500  
4560  
4620  
4680  
4740  
4800  
4880  
4920  
4980  
5040  
5100  
5160  
5220  
5280  
5340  
5400  
5480  
5520  
5580  
5640  
5700  
5760  
5820  
5880  
5940

agttogttgt	antttttgt	tttttgatt	agttgattt	ttttgtttan	tttttloggt	6000
agttgattgt	ataggtogtt	attatattgt	ttatgtattt	tttttttgt	tttttagtgg	6080
tttttttttt	attatgtttg	ttagatgtgt	ttgtatttt	tttttlogtg	tttttloggt	6120
tttttttttt	taagtattgt	ggatttttgg	atgtattgtt	tttttloggt	taatttttgt	6180
tttttttttt	ttatttttgg	tgttttttgg	atagattttt	agatttttgt	tttttttttt	6240
aaattttttt	agaaatttgt	ttttgttgt	attttttttt	tttttaaggt	atttttgtgt	6300
tttttttttt	tttttttttt	agttatttgg	gaatttttgt	tttttttttt	tttttttttt	6360
ttagtttttt	gttttttttt	tttgggtttg	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	6420
gtttgtttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	atgtttttgt	tttttttgtt	ggatttttgt	6480
gtttgtttgt	tttttttgtt	tgtgttttgt	gtttttttgt	atttttttgt	tttttttgtt	6540
ttgtttttgt	tttttttgtt	gttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6600
ttgtttttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6660
ttgtttttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6720
agttttttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6780
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6840
gttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6900
gttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	6960
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7020
atttttttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7080
atgttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7140
atgttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7200
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7260
gttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7320
atttttttgt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7380
atgttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7440
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7500
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7560
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7620
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7680
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7740
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7800
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7860
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7920
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	7980
tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	tttttttgtt	8000

## 【图 3 2】

tttgggtgt	tttttttgt	tttttttta	ttttttttt	ttttttttt	ttttttttt	7980
gttttttgt	gttttttatt	aggtttttt	tgggttttt	ttttttttt	ttttttttt	8000
tttttgttg	tttttttgt	tggtttttg	tgggttggg	gatttttgtt	ttttttttt	8140
gatttttgtt	ttttgggttt	tttttttgt	gtttttggg	gagatttgtt	gattttttt	8160
agattttgtg	agatttttata	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	agatttttt	8220
ttttttttt	agatttttgt	tttttttgt	gattttttt	agtttttgt	agatttttt	8280
tttttttgt	tttttttgt	aggttttgt	aggttttgt	tttttttgt	tttttttgt	8340
aggttttgt	tttttgttg	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	8400
gttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	tttttttgt	8460
tttttttgt	tttttttgt	aggttttgt	aggttttgt	tttttttgt	tttttttgt	8520
tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	8580
tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	8640
tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	tttttgttg	8700
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	8760
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	8820
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	8880
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	8940
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9000
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9060
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9120
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9180
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9240
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9300
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9360
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9420
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9480
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9540
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9600
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9660
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9720
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9780
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9840
gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	gttttgttg	9900

[illegible]

【图 3 3】

[illegible]

## 【图 3 4】

[illegible]

【 ㊦ 3 5 】

[illegible]

## 【图 3 6】

atgaatagt	gagtttga	ttoaanitta	gatttttga	ttttgagt	tatttttt	17880
atttttgt	tatttgtt	gtatttttt	ggagttttt	gatttttt	tttttgtt	17940
gattttga	tgtatntaa	gagagttat	taattgttt	agagttat	tttttgtat	18000
ttoagttaa	ttttttttg	ggagttatg	gatttttt	tttgtttt	ggagtttgt	18060
tatttttt	ttttttttg	gttgtttt	tttttttt	ttttttga	atttttgt	18120
ttttttga	ggagttat	tttttttt	tttttttt	tttttttt	tttttgtt	18180
ggattttt	tttttttt	attttttt	tttttttt	tttttttt	ggagtttt	18240
ttttttga	tttttgtt	ttttttga	ggattttga	tttttgtt	tttttgtt	18300
ggattttt	gttttttt	tttttgtt	tttttgtt	tttttgtt	tttttgtt	18360
attttttt	gatttttt	tttttgtt	tttttgtt	tttttgtt	tttttgtt	18420





## 【 図 4 5 】

tatttagat tttttttta tagatagag gttttttat gtgttttag ttgttttaa 15900  
 atttttagt ttatgtatt tttttttta gttttttta agtttttag ttatagagt 15980  
 ggtttattt atttttagt gttttttat ttatatttt agtttttaa ttgtttatt 16020  
 ttgtttatt ttgttttag ttatattag tttttttta agtttttaa ttgtttatt 16080  
 ttgtttatt ttatattag ttgtttatt attttttt ttgttttag ttgtttatt 16140  
 ttgtttatt agtttttag ttgtttatt tttttttt attttttt ttgtttatt 16200  
 gttttttt agtttttag ttgtttatt ttgttttag ttatattt ttgtttatt 16260  
 gttttttt agtttttag ttgtttatt tttttttt tttttttt ttgttttag 16320  
 gttttttt agtttttag ttgttttag ttgttttag ttatattt ttgtttatt 16380  
 attttttt ttatattag tttttttt ttgtttttt ttgttttag ttatattt 16440  
 ttgtttatt ttgttttag tttttttt ttgttttag ttgtttttt ttatattt 16500  
 ttgtttatt ttatattt ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt 16560  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttatattt ttatattt ttatattt 16620  
 ttgtttatt ttatattt ttatattt ttatattt ttatattt ttatattt 16680  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 16740  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 16800  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 16860  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 16920  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 16980  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17040  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17100  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17160  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17220  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17280  
 GGGGAGGGT GGTAGGGGG GGGTTGAGT TAGGGGATA GTTGTGATA GTGGTTAAG 17340  
 TAGGTGAGG AAGATGTT TAGTATAG TTATTTTTT TTGATTTTG TTGTATAGT 17400  
 TAGTATAGT TAGTATAGT TTATTTTTT TTGATTTTG TTGTATAGT 17460  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17520  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17580  
 ttgtttatt agtttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17640  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17700  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17760  
 gttttttt ttatattt ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt 17820

## 【 図 4 6 】

agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17880  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 17940  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18000  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18060  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18120  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18180  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18240  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18300  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18360  
 agtttttag ttgttttag ttatattt ttgtttttt ttatattt ttatattt 18404

## 【 図 4 7 】

(a)

Wild type DNA

5'-AGCTC8CGATGCCAGCTGGCTCG-3' sense strand  
 3'-TCGAGCGCTACGGTCGAGCGAGC-5' antisense strand

(b)

Blauflied

5'-AGTTCC8CGATGTTAGTTGGTTCC-3' sense strand  
 3'-TTGAGCGCTATGGTTGAGCGAGC-5' antisense strand

(c)

FW primer

5'-AGTTCC8CGA  
 5'-AGTTCC8CGATGTTAGTTGGTTCC-3' sense strand  
 3'-TCAAGCAAGC-5' RV primer

(d)

FW primer

5'-AAGTC8CGA  
 3'-TTGAGCGCTATGGTTGAGCGAGC-5' antisense strand  
 3'-TTGAGCGAGC-5' RV primer

## 【 図 4 8 】

(a)

REP-S1 : 5'-CAGGCCAGTGGAGTGGCAG-3'

(b)

REP-AS1 : 5'-GAGGAGGTGACGCTAGTCTG-3'

(c)

(H7441)

CAGGCCAGTGGAGTGGCAGGCCAGAACTGGGACCAACCGGGGGTGGTGA

REP-S1

HpaII

GGCGGCGCGGCACTGGGAGCTGCATCTGAGGCTTAGTCCCTGAGCTCTCT

HpaII

GCCTGCCAGACTAGCTGCACCTCTC (H7596)

REP-AS1



## 【 4 9 】

(a)

REP-S2 : 5'-GAAAGCACTGGCTTTGGAAC-3'

(b)

REP-AS2 : 5'-ATCGAGTGAATCCTGCTGAT-3'

(c)

(#8858)

CAAAGCACTGGCTTTGGAACCGGACTGTCTGGTTTGAATCCTGGCACTG

REP-S2 Hpa II

CAGCTGACTCACTGATGAGTCAAGCAATGCCCTAAACTCCCTGAGCCTG

AGTTTCCTTGTCTGTAAATGATAAGATAGCCCTGTTTCATAGGGCTGT

GGTGAGAAACCAATCAGACAAGGCATGTGAACGCCATTATAGCAGAGG

CCCGCATCCAGCAGGACTCACTGAT (#7084)

Hpa II REP-AS2

## 【 5 0 】

(a)

SHP1-PF1: 5'-TGTCTGGAGGCCACGGTCAATGA-3'

(b)

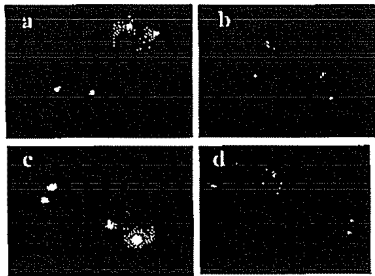
SHP1-PR1: 5'-GTTTGTATTGGTTGTGTGTCATGCTC-3'

## 【 5 3 】

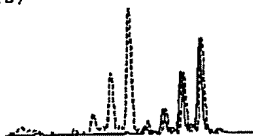
(a)

FISH analysis of ILTMot and NK-YS cells with chromosome 12 or SHP1-specific probes

cells	probe	positive signal No.(%)					
		0	1	2	3	4	more
ILTMot	Ch #12	1	1	97	1	0	0
	SHP1	1	2	95	1	1	0
NK-YS	Ch #12	0	0	99	1	0	0
	SHP1	1	3	91	4	1	0



(b)



Microsatellite marker	LOH
D12S356	15/19 (79 %)
D12S336	6/16 (38 %)

## 【 5 1 】

(a)

SHP-LF1: 5'-CCGAGTTCATTGAAACCACT-3'

(b)

SHP-LR1: 5'-CGTTGCTTGTCTGCTTGTGT-3'

## 【 5 2 】

(a)

MF2 : 5'-GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC-3'

(b)

MR2 : 5'-TCAGGCATACGAACCAACG-3'

(c)

(#7037)

GAACGCCATTATAGCAGCGCCCGCATCCAGCAGGACTCACTGAT

MF2

GACAGTTGTACCGCCATCATTGTTATTAGCGTGGGCCAGGGAGGGCT

GCSTAAAGCAGCTGCTGGAGGAGGAGAGATGCCGTGGGACCGTCTGGGTTCCGATCGGTGA (#7105)

MR2

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	A
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 A
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 J
F ターム (参考)	4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ33 QQ43 QQ53 QQ62 QR08 QR14 QR32	
	QR50 QR62 QS11 QS16 QS25 QS34	